

Aus dem pharmakologischen Institut  
Direktor: Prof. Dr. Thomas Worzfeld  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Der Einfluss von Östrogen auf die Ausbildung eines nukleären  
Aktinnetzwerks in Mammakarzinomzellen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Mareike Franziska Katharina Schnurbus (geb. Simeit)  
aus Siegen

Marburg, 2020

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 06.08.2020.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. med. Frank Czubayko

1.Koreferent: Prof. Dr. Holger Garn

Diese Arbeit widme ich meinem Vater Michael Simeit (1953-2007)

*„Du kannst was, mach‘ was draus!“*

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung .....	1
Summary .....	2
2. Einleitung.....	3
2.1. Polymerisierung und Depolymerisierung von Aktinfilamenten.....	5
2.2. Aktin-bindende Proteine .....	7
2.3. Nukleäre Aktinnetzwerke in NIH-3T3 Zellen .....	10
2.4. Nukleäre Aktinfilamente beeinflussen die Chromatinreorganisation während der Mitose.....	13
2.5. Die Rolle des nukleären F-Aktins bei DNA-Strangbrüchen .....	14
2.6. Der Einfluss des Steroidhormons Östrogen auf die Genexpression.....	15
2.7. Auswirkungen der Östrogensignalwirkung bei Mammakarzinomen .....	18
2.8. Nukleäre Aktinfilamente als möglicher dynamischer Bestandteil der Genexpression und ihrer Regulierung .....	22
2.9. Fragestellungen der Arbeit .....	24
3. Materialien und Methoden .....	25
3.1. Gentechnische Methoden.....	26
3.1.1. Real Time quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR).....	26
3.2. Zellbiologische Methoden .....	28
3.2.1. Zellkultur .....	28
3.2.2. Stimulationsversuche mit diversen Tumorzelllinien.....	29
3.2.3. Wachstumsanalysen mittels WST-Reagenz .....	30
3.2.4. Transiente Transfektion von MCF-7 Zellen für einen ER $\alpha$ Knockdown .....	32
3.3. Generierung stabiler Zelllinien .....	33
3.3.1. Calcium-Phosphat-Präzipitation in HEK239T Zellen zur Generierung lentiviraler Überstände.....	33
3.3.2. Lentivirale Transduktion von MCF-7 Zellen zur Erlangung von R62D-Mutanten .....	34
3.4. Mikroskopie .....	35
3.4.1. Fluoreszenzmikroskopie.....	35

3.4.2. Live Cell Imaging.....	35
3.4.3. Soft-Agar-Assays .....	37
3.4.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot .....	38
4. Ergebnisse.....	39
4.1. Untersuchungen zur Ausbildung von nukleären Aktinfilamenten in diversen Tumorzelllinien .....	39
4.2. Der Einfluss von Östrogen auf die Ausbildung nukleärer Aktinfilamente in MCF-7 Brustkrebszellen.....	44
4.2.1. Der Einfluss von Östrogen auf die Quantität von MCF-7 Zellen mit nukleärem F-Aktin.....	48
4.2.2. Die Wirkung von Östrogen auf die Phosphorylierung von Cofilin .....	50
4.2.3. Expression von Cofilin nach Östrogengabe auf RNA- Level mittels qPCR	52
4.3. Proliferation und Generierung nukleärer Aktinfilamente bei dysfunktionaler R62D Aktinmutante in MCF-7 Zellen .....	53
4.3.1. Einfluss der dysregulierten R62D-Aktinmutante auf die Proliferation von MCF-7 Zellen .....	55
4.3.2. Einfluss der R62D-Aktinmutante auf die Ausbildung nukleärer Aktinfilamente .....	58
4.4. Einfluss der nukleären Expression der R62D-Aktinmutante auf die Expression ausgewählter Östrogen-responsiver Gene .....	59
5. Diskussion .....	64
5.1. Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung von Aktinfilamenten in MCF-7 Zellen ..	66
5.2. Problematik langzeit-kultivierter Tumorzelllinien .....	68
5.3. Adaptation von laborspezifischen Arbeitsschritten im Umgang mit Östrogen-responsiven Tumorzellen.....	69
5.4. Real Time PCR Versuche.....	69
5.5. Der Einfluss von Östrogen auf die Quantität von Zellen mit nukleärem F-Aktin	70
5.6. Gene .....	70
5.7. Ausblick.....	72
5.7.1. Screening weiterer Zelllinien auf nukleäres F-Aktin .....	72
5.7.2. Androgen-responsive Tumorzellen.....	72

5.7.3. SbCl <sub>2</sub> Melanomzellen .....	74
5.7.4. Genom-wide Sequencing .....	75
5.7.5. Chromatinreorganisation MCF-7 .....	75
6. Literaturverzeichnis.....	78
7. Anhänge .....	a
7.1. Meine akademischen Lehrenden in Marburg.....	b
7.2. Danksagung .....	c

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Darstellung von Aktinfilamenten.....	5
Abb. 2: Darstellung der Aktinpolymerisierung mit Entstehung eines Fließgleichgewichts zwischen Plus- und Minus-Ende .....	6
Abb. 3: Funktionen der verschiedenen Aktin-bindenden Proteine .....	7
Abb. 4: Darstellung eines dynamischen nukleären Aktinnetzwerks in NIH-3T3 Zellen	12
Abb. 5: Übersicht über die molekularen Effekte des Östrogenrezeptors .....	18
Abb. 6: Östrogen-Wirkungen auf Proliferation und Metastasierung von Tumorzellen ..	21
Abb. 7: Das lösliche Tetrazoliumsalz (WST-1) wird mittels mitochondrialer Enzyme zu Formazan reduziert.....	30
Abb. 8: 96-Well Platte mit unterschiedlichen Proben von MCF-7 Zellen.....	31
Abb. 9: Darstellung des pInducer20 Vektors .....	35
Abb. 10: Darstellung der Interaktion von Aktin mit dem Nuclear Actin Chromobody (nAC) .....	36
Abb. 11: Nachweis nukleärer Aktinfilamente in fixierten Tumorzelllinien .....	42
Abb. 12: Ausbildung nukleärer Aktinfilamenten während der Mitose in lebenden MCF-7 Zellen.....	43
Abb. 13: Proliferation von MCF-7 Zellen auf Plastikoberflächen nach Östrogenstimulation .....	45
Abb. 14: Spezifischer siRNA vermittelter Knockdown des Östrogenrezeptors ER $\alpha$ in MCF-7 Zellen .....	46
Abb. 15: Kolonienwachstum von MCF-7 Zellen im Softagar-Assay nach Östrogenstimulation .....	47
Abb. 16: Auswertung der Soft-Agar Experimente.....	47

Abb. 17: Repräsentative MCF-7- Zelle mit nukleären Aktinfilamenten nach Östrogengabe .....	49
Abb. 18: Quantifizierung der Anzahl der MCF-7 Zellen mit nukleären Aktinfilamenten nach Vorbehandlung mit unterschiedlichen Östrogenkonzentrationen .....	50
Abb. 19: Schematische Darstellung der Beeinflussung von Cofilin durch Östrogen ....	51
Abb. 20: Proteinexpression von p-Cofilin (Abb. 20a) und Gesamt-Cofilin (Abb. 20b) in MCF-7 Zellen nach Östrogenbehandlung.....	52
Abb. 21: Ermittlung der Gesamt-Cofilin-Expression auf RNA-Ebene mittels qPCR bei mit unterschiedlichen Östrogenkonzentrationen vorbehandelten MCF-7 Zellen ...	53
Abb. 22: MCF-7 Zellen nach stabiler Transfektion mit R62D Expression .....	55
Abb. 23: Einfluss der R62D-Aktinmutante auf Proliferation von MCF-7 Zellen auf Plastikoberflächen nach Östrogenstimulation.....	56
Abb. 24: Kolonienwachstum von MCF-7 Wildtypzellen (Abb. 24a) im Vergleich zu R62D-Aktin exprimierenden Zellen (Abb. 24b) im Soft-Agar-Assay .....	57
Abb. 25: Auswertung der Soft-Agar Experimente .....	57
Abb. 26: Einfluss der Expression der R62D-Aktinmutante auf die Ausbildung nukleärer Aktinfilamente .....	59
Abb. 27: Expressionsrate ausgewählter Gene bei MCF-7 Zellen mit R62D-Aktin nach Östrogenbehandlung.....	62
Abb. 28: Expressionsrate ausgewählter Gene bei MCF-7 Zellen mit R62D-Aktin ohne Östrogenbehandlung.....	63
Abb. 29: Vergleich von MCF-7 Zellen mit R62D-Aktin mit und ohne Östrogenbehandlung .....	64
 Tab. 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebserkrankungen in Deutschland 2014.....	20
Tab. 2: Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien .....	26
Tab. 3: Verwendete Primerpaare .....	27
Tab. 4: Einstellungen des verwendeten qPCR-Programms.....	28
Tab. 5: Sequenzen der siRNAs für Knockdown Experimente mit dem Östrogenrezeptor $\alpha$ .....	33
Tab. 6: Auflistung diverser maligner Tumoren, mit dazugehörigen Mutationen und Zelllinien.....	40
Tab. 7: Östrogen-responsive Gene mit dazugehörigem Genprodukt und wichtigen Funktionen .....	60

## Abkürzungsverzeichnis

3C	Chromosome Conformation Capture
ADF	Actin depolymerization factor
AFs	Activation function domains
AR	Androgenrezeptor
Bcl2	B-Cell Lymphoma 2
BRCA1	Human Breast Cancer 1
BSA	Bovine Serum albumin
CRPC	Castration resistant prostate cancer
CSK	Cytoskeletonbuffer
DBD	DNA bindende Domäne
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOX	Doxycyclin
eGfP	Enhanced GfP
ERE	Estrogen response element
ER $\alpha$	Estrogen-Receptor $\alpha$
FCS	Fetal calf serum, fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in situ- Hybridisierung
FOXA1	Forkhead Box Protein A1
FWD	Forward (Primer)
GfP	Green fluorescent protein
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
GP130	G-protein coupled estrogen receptor 1
kDa	Kilodalton
LBD	Liganden bindende Domäne
LIMK	LIM-Kinase
MAL	Megakaryocytic acute leukemia
MCF-7	Michigan-Cancer-Foundation-7
Myc	Myelomatosis oncogene



nAC	Nuclear Actin Chromobody
NFκB	Nuclear Factor κB
NLS	Nuclear localization signal, Kernlokalisationssignal;
NTD	N-terminale Domäne
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate-buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction
qPCR	Real-time quantitative PCR
Rab17	Ras-related protein 17
REV	Reverse (Primer)
RNA	Ribonukleinsäure
siCtrl	Kontroll-siRNA
siRNA	Small interfering RNA
SRF	Serum response factor
TBST	Tris Buffered Saline with Tween
TP53	Human tumor protein p53
v-Fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
v-Jun	Human v-Jun sarcoma virus 17 oncogene homolog
WT	Wildtyp

## 1. Zusammenfassung

Als essenzieller Bestandteil des Zytoskeletts in eukaryoten Zellen haben Aktinfilamente Anteil an verschiedensten wichtigen zellulären Prozessen. Viele davon beziehen sich auf dynamische Prozesse innerhalb von Zellen (Vesikeltransport) als auch auf die Motilität von Zellen an sich (Migration, Adhäsion). Immer häufiger wird jedoch noch eine viel weitreichendere Aufgabe von Aktinfilamenten diskutiert: Ihr möglicher Anteil an der Regulation der Genexpression. Bisher gibt es noch keine abschließenden Erklärungen dafür, wie genau der dynamische Prozess funktioniert, bei dem sich über tausende Basenpaare entfernte Promotoren und Enhancer oder Silencer räumlich aneinander annähern. Mehrfach ist beschrieben, dass Aktinfilamente (F-Aktin) hierbei eine maßgebliche Rolle zu spielen scheinen. Ein entsprechender Nachweis konnte jedoch noch nicht sicher erbracht werden, zumal lange Zeit davon ausgegangen wurde, dass im Zellkern lediglich Aktinmonomere (G-Aktin) vorhanden ist. Seit einigen Jahren ist dieser Umstand jedoch widerlegt, Aktinfilamente konnten im Zellkern von diversen Zelllinien nachgewiesen werden. Hierbei stellte sich nun erneut die Frage, wie diese Aktinfilamente an der Genexpression beteiligt sein und was diese Interaktion beeinflussen könnte. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass die bekanntermaßen mit Östrogenrezeptoren ausgestattete humane Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nicht nur nukleäre Aktinfilamente aufweist, sondern dass das Maß an sich bildenden nukleären Aktinfilamenten nach Serumstimulation abhängig von einer zuvor applizierten Konzentration an Östrogen zu sein scheint. In dieser Arbeit wurde als möglicher Erklärungsansatz zur vermehrten Bildung von nukleärem F-Aktin nach Östrogenvorbehandlung eine von der Östrogenkonzentration abhängige verminderte Expression des Proteins Cofilin dargestellt. Östrogen führt bei der erwähnten Zelllinie über den Östrogenrezeptor ER $\alpha$  bekanntermaßen zur Proliferation, was auch in dieser Arbeit durch diverse Wachstumsassays bestätigt werden konnte. Bekannt ist ebenfalls, dass nach Östrogenbindung an den ER $\alpha$  dieser als Transkriptionsfaktor für diverse Gene tätig wird. Zu diesen Genen zählen unter anderem BRCA1, FOXA1 oder auch TP53. Genannte Gene üben vielfältige Einflüsse auf Zellen aus. In dieser Arbeit wurde untersucht inwieweit nukleäre Aktinfilamente im Zusammenwirken mit Östrogen an der Expression von bekanntermaßen Östrogen-responsiven Genen beteiligt sind. Direkt verglichen wurden hierbei mit Östrogen vorbehandelte MCF-7 Zellen, wovon die einen eine Wildtyp-Variante des Aktins aufwiesen, wohingegen die anderen eine dysfunktionale Aktinvariante (R62D-Aktin, fehlende Aktinpolymerisierung) exprimierten.

In Zusammenschau der gewonnenen präliminären Ergebnisse zeigte sich keine einfache Ursache-Wirkungs-Beziehung zwischen Östrogen, nukleärem F-Aktin und bestimmten Genen. Es eröffneten sich jedoch vielfältige neue Fragestellungen hinsichtlich der wohl äußerst komplexen Funktion von F-Aktin bei der Expression unterschiedlicher Gene in humanen Tumorzellen, sowie deren Beeinflussung durch Steroidhormonen als äußere Faktoren.

## Summary

As an essential component of the cytoskeleton in eukaryotic cells, actin filaments participate in various important cellular processes. Many of these relate to dynamic processes within cells (vesicle transport) as well as the motility of cells themselves (migration, adhesion). However, a much more far-reaching task of actin filaments is being discussed: Their possible contribution to the regulation of gene expression. So far, there are no conclusive explanations as to the exact nature of the dynamic process, which leads to the approach of silencers, promoters and enhancers, separated by thousands of base-pairs. It has been repeatedly described that actin filaments (F-actin) seem to play a significant role in this process. However, such evidence has not yet been provided with certainty, especially as it has long been assumed that only actin monomers (G-actin) are present in the cell nucleus. For some years, however, this fact has been refuted, actin filaments could be detected in the cell nucleus of various cell lines. Here again the question arose, how these actin filaments are involved in gene expression and what might influence this interaction. In the context of this work it was shown that the human breast cancer cell line MCF-7 known to possess estrogen receptors not only has nuclear actin filaments but that the amount of nuclear actin filaments forming after serum stimulation seems to be dependent on a previously applied concentration of estrogen. In this work, as a possible explanation for the increased formation of nuclear F-actin after estrogen pretreatment an estrogen concentration-dependent decreased expression of the protein cofilin was shown. Estrogen leads in the mentioned cell line via the estrogen receptor ER $\alpha$  known to proliferation, which could be confirmed in this work by various growth assays. It is also known that after estrogen binding to the ER $\alpha$  this becomes active as a transcription factor for various genes. These genes include, but are not limited to, BRCA1, FOXA1 or TP53. Genes exert diverse influences on cells. In this work, it was investigated to what extent nuclear actin filaments in interaction with estrogen are involved in the expression of known estrogen-responsive genes. Here, estrogen-pretreated MCF-7 cells were compared directly, one of which had a wild-type variant of

actin, whereas the other expressed a dysfunctional actin variant (R62D actin, lack of actin polymerization). In summary of the preliminary results obtained, there was no simple cause-and-effect relationship between estrogen, nuclear F-actin, and certain genes. However, a variety of new questions regarding the probably extremely complex function of F-actin in the expression of different genes in human tumor cells, as well as their influence by steroid hormones as external factors opened up.

## 2. Einleitung

Aktin (griech. ἀκτίς = „Strahl“) ist ein in sämtlichen eukaryotischen Zellen vorkommendes 42 kDa großes Strukturprotein, welches als Bestandteil der sogenannten Mikrofilamente neben Intermediärfilamenten und Mikrotubuli das Zytoskelett von Zellen bildet (Karp, 2005, S. 457) (Fletcher et al., 2010) (Pollard, 2016). Als wichtigste Funktionen des Zytoskeletts sind zu nennen:

1. Die Organisation von Transportprozessen innerhalb von Zellen (Fletcher et al., 2010).
2. Formgebung und Formveränderung der Zellstruktur sowie Zellmotilität (Fletcher et al., 2010).
3. Verbindungseinheit zwischen Zelle und Umwelt (Fletcher et al., 2010).

Der Transport unterschiedlichster Partikel kann innerhalb der Zelle über ein Zusammenspiel von Aktin und bestimmten Myosinen erfolgen (Karp, 2005, S. 464). Hierbei findet die Aufnahme des „Transportguts“ durch Myosin statt, welches dieses entlang filamentöser Aktinstrukturen innerhalb des Zytoplasmas transportiert (Karp, 2005, S. 464).

Formgebung und -veränderung der Zellstruktur sind möglich, weil sich die einzelnen Komponenten des Zytoskeletts dynamisch zu Netzwerken organisieren können (Fletcher et al., 2010). Dies stellt ebenfalls eine wichtige Voraussetzung für die Beweglichkeit von Zellen dar, denn insbesondere durch gebündelte Aktinstrukturen können Zellen kleine Ausläufer (Pseudopodien) bilden, die ihre Fortbewegung ermöglichen (Karp, 2005, S. 478; Fletcher et al., 2010). Hervorzuheben ist dabei insbesondere die zelluläre Motilität, welcher im Rahmen der Metastasierung von Tumorzellen eine Schlüsselfunktion zukommt (Yamaguchi & Condeelis, 2007).

Auch die Aufnahme exogener Partikel mittels Endozytose weist eine Beteiligung des Zytoskeletts auf, indem hier unter anderem Aktinfilamente dafür sorgen, dass eine Internalisierung eines betreffenden Zellmembranabschnitts als endozytotisches Vesikel stattfindet (Fletcher et al., 2010).

Damit oben genannte Prozesse stattfinden können, ist zudem eine Interaktion der Komponenten des Zytoskeletts mit vielerlei Proteinen wie Nukleatoren, die die Bildung von filamentösen Strukturen begünstigen, „Capping“ Proteinen, die diese wieder terminieren, sowie Polymerasen, die die Geschwindigkeit oder auch Kontinuität der Filamentbildung beeinflussen oder auch „Severing“ Proteinen und depolymerisierenden Faktoren, die die Filamente wieder abbauen und nicht zuletzt Proteinen mit quervernetzender Eigenschaft, notwendig (Fletcher et al., 2010).

Aktin existiert innerhalb von Zellen sowohl in monomerer als auch polymerer Form, wobei die Bindung von ATP (Adenosin-Triphosphat) zur Polymerisierung und damit zur Bildung von flexiblen Filamenten führt (Karp, 2005, S. 457). Strukturell betrachtet, bestehen Aktinfilamente aus zwei spiralig ineinander gewundenen Strängen von aneinandergereihten Aktinmonomeren (s. Abb. 1a und Abb. 1b) (Karp, 2005, S. 457). Jedes Monomer hat dabei vier Untereinheiten und eine ATP-Bindungsstelle (Karp, 2005, S. 457). Aktin in seiner polymerisierten, beziehungsweise filamentösen Form wird auch als „F-Aktin“ bezeichnet, wohingegen die Monomere auch als „G-Aktin“ beschrieben werden (Karp, 2005).

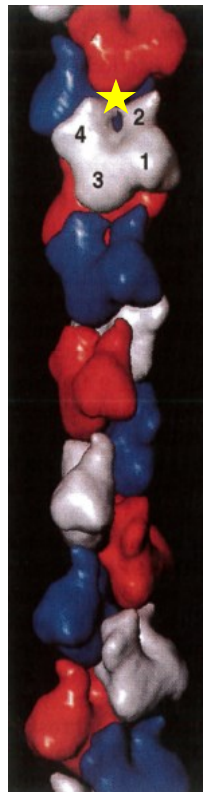


Abb. 1a

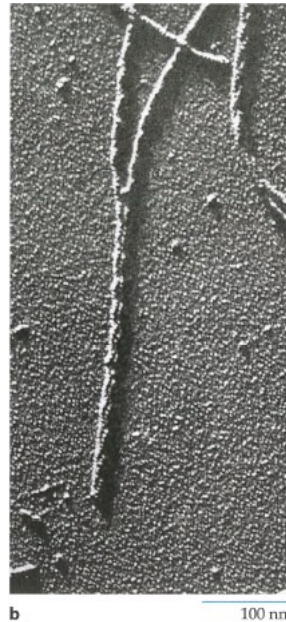


Abb. 1b

## Abb. 1: Darstellung von Aktinfilamenten

### Abb. 1a: Zum Filament zusammengelagerte Aktin-Monomere

Nummeriert sind die einzelnen Untereinheiten eines jeweiligen Monomers. Die Einkerbung (\*) stellt die ATP-Bindungsstelle dar (Karp, 2005, S. 457).

### Abb. 1b: Elektronenmikroskopische Aufnahme vom Abdruck eines Aktinfilaments

Gezeigt ist die spiralförmige Anordnung der Monomere (Karp, 2005, S. 457).

## 2.1. Polymerisierung und Depolymerisierung von Aktinfilamenten

Aktinfilamente weisen eine Polarität auf, das heißt, dass die einzelnen Monomere und somit auch das aus Monomeren zusammengesetzte Filament, in eine spezifische Richtung weisen (Karp, 2005, S. 458). Im Falle einer Bindung von ATP an ein Aktinmonomer lagert sich dieses an andere ATP-Aktinmonomere an und es entsteht die oben genannte F-Aktin-Struktur (Karp, 2005, S. 457-459).

An einem Aktinfilament existiert jeweils ein sogenanntes Plus- (barbed end) als auch ein Minus- Ende (pointed end) (Karp, 2005, S. 459). Bei Vorbestehen eines Aktinfilaments kommt es in Anwesenheit von ATP-Aktinmonomeren einerseits zum Anbau selbiger an

sowohl das Plus- als auch an das Minus-Ende des Filaments (Karp, 2005, S. 459). Dabei ist zu beobachten, dass das Filament am Plus-Ende ein schnelleres Wachstum aufweist als am Minus-Ende, was auf eine höhere Bindungsaffinität des Plus-Endes zu den an ATP gebundenen Monomeren zurückzuführen ist (Karp, 2005, S. 459). Werden die einzelnen Monomere in das Filament eingebaut, kommt es zur Hydrolyse von ATP zu ADP (Adenosin-Diphosphat) (Karp, 2005, S. 458) (s. Abb. 2).

Sobald es zur Abnahme der für den Einbau verfügbaren Monomere kommt, erfolgt die Elongation des Aktinfilaments ausschließlich über das Plus-Ende (Karp, 2005, S. 459). Setzt sich dieser Prozess fort, erfolgt gleichzeitig zum Wachstum am Plus-Ende, die Freisetzung von Monomeren am Minus-Ende des Filaments bis es zum Gleichgewicht der Reaktionen am Plus- und Minus-Ende eines Filaments kommt (Fließgleichgewicht), wobei Länge des Filaments und Konzentration der freien Monomere gleich bleiben (Karp, 2005, S. 459) (s. Abb. 2). Zuvor beschriebener Prozess ist auch unter dem Namen „Tretmühlenmechanismus“ (treadmilling) bekannt (Pollard, 2016).

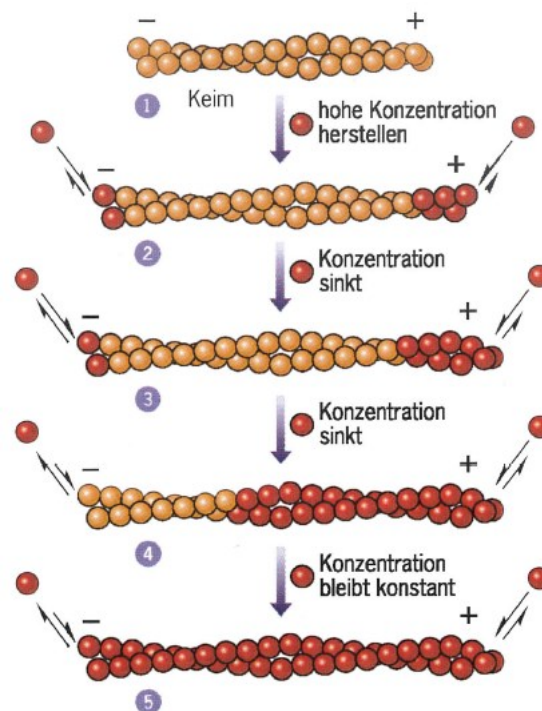


Abb. 2

---

**Abb. 2: Darstellung der Aktinpolymerisierung mit Entstehung eines Fließgleichgewichts zwischen Plus- und Minus-Ende**

Regulation der Aktinpolymerisierung in Abhängigkeit von der Konzentration freier G-Aktin Monomere. Darstellung mit Entstehung eines Fließgleichgewichts zwischen Plus- und Minus-Ende (Karp, 2005, S. 459).

---

Die Geschwindigkeit mit der Aktinfilamente sowohl auf- als auch abgebaut werden, wird außerdem über diverse Aktin-bindende Proteine beeinflusst (Karp, 2005, S. 460). Zu diesen zählen beispielsweise die Proteine Cofilin (Abbau) und Arp 2/3 (Aufbau) (Karp, 2005, S. 474-475).

## 2.2. Aktin-bindende Proteine

Wie bereits erwähnt interagieren eine Vielzahl von Proteinen mit dem Zytoskelett (Fletcher et al., 2010). Vielfältige Auswirkungen auf die Struktur von Aktin können durch unterschiedliche Aktin-bindende-Proteine hervorgerufen werden (s. Abb. 3).

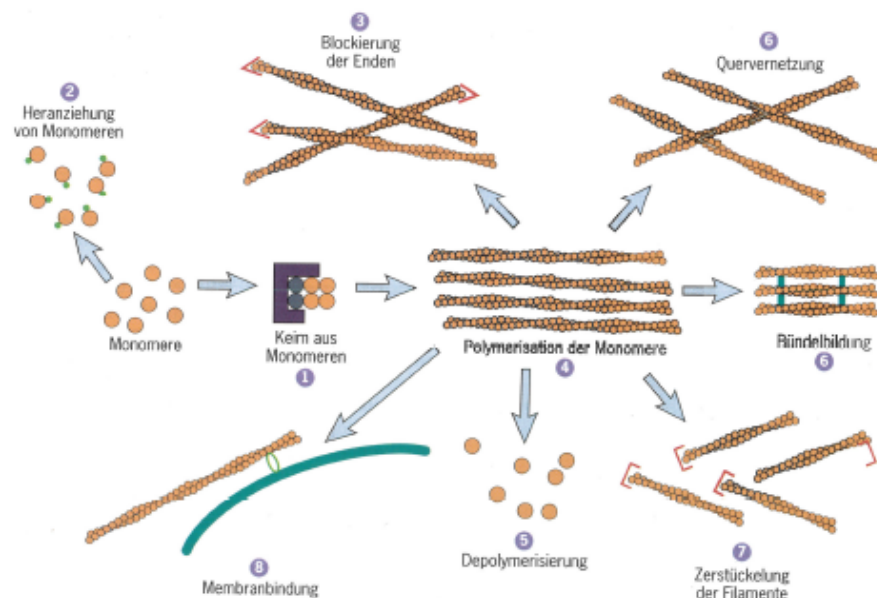


Abb. 3

### Abb. 3: Funktionen der verschiedenen Aktin-bindenden Proteine

Dargestellt sind die unterschiedlichen Auswirkungen von diversen Proteingruppen auf die Entstehung, Vernetzung und den Abbau von Aktinfilamenten. Die einzelnen Proteingruppen werden im Text mit dazugehörigen Nummern eingehender erläutert (Karp, 2005, S. 474).

Für die Polymerisation von Aktin ist das Vorhandensein eines sogenannten „Keims“ von Vorteil, da dieser die Bildung von Aktinfilamenten stark beschleunigen kann (Karp, 2005, S. 474). Als „Keim“ kann z.B. der als *actin-related-protein* ARP2/3-Komplex verwendet werden (Karp, 2005, S. 474) an den sich Aktinmonomere anlagern können (Abb. 3, Nr. 1).



Aktin liegt in Zellen sowohl in monomerer als auch polymerer Form vor (Karp, 2005). Dass nicht sämtliche Aktinmonomere zu Filamenten polymerisieren, liegt unter anderem an der Aktivität von Monomer-Vereinnahmungsproteinen (*actin monomer-sequestering proteins*), (Karp, 2005, S. 475) die die Aktinmonomere an der Polymerisierung hindern. Beispiel hierfür sind Thymosine (Karp, 2005, S. 475). Unterschiedliche Konzentrationen dieser Proteine beeinflussen somit, ob in bestimmten Regionen einer Zelle eher eine Polymerisierung oder eine Depolymerisierung begünstigt wird (Karp, 2005, S. 475) (Abb. 3, Nr. 2).

Die Länge von Aktinfilamenten wird durch sogenannte *capping proteins* reguliert (Karp, 2005, S. 475). Capping Proteine binden an die Enden der Aktinfilamente, was unterschiedliche Auswirkungen haben kann: Kommt es lediglich zum Capping am schnell wachsenden ( + ) - Ende eines Filaments, kann am ( - ) - Ende die Depolymerisation des Filaments erfolgen. Kommt es jedoch zum Capping an beiden Enden des Aktinfilaments, so bleibt das betreffende Aktinfilament zunächst bestehen (Karp, 2005, S. 475). Ein Vertreter dieser Proteingruppe ist das Protein capZ (Karp, 2005, S. 475) (Abb. 3, Nr. 3).

Profilin zählt zu der Gruppe der Polymerisierungsproteine (Karp, 2005, S. 475) welches die Dissoziation von ADP an Aktin-Monomeren katalysiert, welches anschließend durch ATP ersetzt wird (Karp, 2005, S. 475). Auf diese Weise stehen die Aktinmonomere dann für die Polymerisierung zu Filamenten zur Verfügung (Karp, 2005, S. 475). Profilin interagiert zudem mit einer Vielzahl an weiteren Bindungspartnern, was einen Einfluss auf den Aktin Auf- und Abbau hat (Pollard, 2016). Als wichtiger Partner sind hier Formine (Pollard, 2016) zu nennen, auf die im Weiteren noch eingegangen wird. (Abb. 3, Nr. 4).

Zu den Depolymerisierungsproteinen zählt Cofilin (Karp, 2005, S. 475; Pollard, 2016). Diese Proteine werden benötigt, um einen schnellen Umsatz von Aktinfilamenten herbeizuführen (Karp, 2005, S. 475). Dazu binden Proteine dieser Gruppe an Aktin-ADP Untereinheiten und sorgen für ein *severing* (= Durchtrennen) der Aktinfilamente. Darüber hinaus können sie die Depolymerisation am ( - ) - Ende des Filaments begünstigen (Karp, 2005, S. 475; Pollard, 2016). Dies ist besonders relevant bei dynamischen Prozessen wie der Fortbewegung der Zelle, aber auch bei der Phagozytose oder Zytokinese (Karp, 2005, S. 475) (Abb. 3, Nr. 5).

Quervernetzungsproteine wie Filamin sorgen für Verknüpfung von Aktinfilamenten, sodass ein lockeres Geflecht aus mehreren Filamenten entsteht (Karp, 2005, S. 475), was für die Stabilisierung von Strukturen wie Mikrovilli oder Filopodien essentiell ist (Pollard, 2016). Andere Quervernetzungsproteine wie Fimbrin können zur Anordnung der Aktinfilamente in Bündeln führen (Karp, 2005, S. 475) (Abb. 3, Nr. 6).

Proteine wie Gelsolin werden als Filament-Zerstörungsproteine bezeichnet, da diese sich an bestehende Filamente anlagern und ihre Durchtrennung herbeiführen können (Karp, 2005, S. 475; Pollard, 2016). Dies stellt eine wichtige Funktion dieser Proteinklasse dar, denn gleichzeitig werden auf diese Weise Aktinmonomere bereitgestellt, welche an anderer Stelle wiederum eingebaut werden können (Karp, 2005, S. 475,476). Auch das bereits erwähnte Cofilin kann Filamente durchtrennen (Karp, 2005, S. 476) (Abb. 3, Nr. 7).

Bei der hier zuletzt erwähnten Gruppe von Aktin-bindenden-Proteinen handelt es sich um Membran-bindende Proteine. Diese haben die Aufgabe Aktinfilamente an die Plasmamembran zu koppeln, um auf diese Weise das nach Außen- oder -Innenwölben der Membran bei Vorgängen wie Phagozytose oder Fortbewegung der Zellen zu ermöglichen (Karp, 2005, S. 476). Vertreter dieser Gruppe sind Vinculin und Ezrin (Karp, 2005, S. 476) (Abb. 3, Nr. 8).

Die oben durchgeführte Aufstellung von unterschiedlichen Gruppen Aktin-bindender Proteine zeigt lediglich einen kleinen Ausschnitt der Summe der Faktoren, die Aktin beeinflussen können. Auch die Aktin-bindenden Proteine werden durch eine Vielzahl anderer Faktoren beeinflusst, was sich somit indirekt auf Aktin auswirken kann. So konnten (Yuen et al., 2011) zeigen, dass das Steroidhormon Östrogen in neuronalen Zellen über zwischengeschaltete Kinasen die Aktivität von Cofilin beeinflussen kann (s. Kapitel 4.2.2. „Die Wirkung von Östrogen auf die Phosphorylierung von Cofilin“) und Formine, oben als wichtiger Bindungspartner der Polymerisierungsproteine genannt, die Elongation von Aktinfilamenten fördern können (Pollard, 2016). Auch bei der Entstehung nukleärer Aktinnetzwerke kommt diesen Proteinen eine entscheidende Rolle zu (s. Kapitel 2.3. „Nukleäre Aktinnetzwerke in NIH-3T3 Zellen“).

Formine selbst wiederum werden ebenfalls von einer Reihe Regulatoren beeinflusst (Baarlink, Brandt, & Grosse, SnapShot: Formins, 2010). Auch konnten bei gestörter Forminfunktion Assoziationen zu unterschiedlichen Erkrankungen, wie z.B. dem Non-Hodgkin Lymphomen, festgestellt werden (Baarlink, Brandt, & Grosse, SnapShot: Formins, 2010). Da diese Proteine nahezu ubiquitär vorkommen (Baarlink, Brandt, & Grosse, SnapShot: Formins, 2010), ist die Bandbreite an möglichen Defekten bei Dysregulation umfangreich.

Deutlich zu erkennen ist, dass Aktin als zentraler Bestandteil essenzieller Zellfunktionen auf äußerst komplexe Art und Weise beeinflusst wird. Die Komplexität dieses Aktin regulierenden Systems setzt sich hier insbesondere aus einer hohen Anzahl an beteiligten Einflussnehmern (Proteinen) zusammen, sowie aus deren vielfältigen Funktionen und Interaktionen.

Daher ist es von Interesse weitere Einsicht in Aktin-Dynamiken zu gewinnen, um Aufschluss über deren mögliche Auswirkungen oder Beteiligungen an der Entstehung von Krankheitsgeschehen zu erhalten.

### 2.3. Nukleäre Aktinnetzwerke in NIH-3T3 Zellen

Bis vor kurzem waren im Zellkern lediglich für das monomeren G-Aktin Funktionen bekannt. Die Vermutung, dass Aktin auch in polymerisierter Form eine funktionale Rolle innerhalb des Zellkerns hat, wurde bereits vielfach geäußert (Falahzadeh et al., 2015), jedoch fehlte es an einem eindeutigen Nachweis hierfür. Dies lag zum einen an der sehr hohen Aktinkonzentration im Cytosol im Vergleich zum Zellkern und zum anderen an insuffizienten Färbetechniken für Aktinfilamente im Zellkern lebender Zellen. Nach der Etablierung neuer Färbetechniken, konnten in einer Arbeit aus dem Labor von Robert Grosse aus Marburg Baarlink et al 2013 erstmalig in lebenden NIH-3T3 Zellen das Vorhandensein eines dynamischen nukleären filamentösen Netzwerks zeigen, welches innerhalb weniger Minuten nach Serumstimulation auf- und wieder abgebaut wurde (Baarlink, Wang, &Grosse, 2013).

Die Ausbildung dieses Netzwerks wurde durch die Formine mDia1 und mDia2, welche als potente Aktivator der Polymerisierung des Aktins zu Filamenten im Zytoplasma bekannt sind, reguliert (Baarlink, Wang, &Grosse, 2013). Demnach wird durch dynamische Prozesse von nukleärem G-Aktin die Aktivität des sogenannten Serum-Response-Factors (SRF) reguliert. Der SRF hat die Funktion eines Transkriptionsfaktors, welcher insbesondere in der frühen Embryogenese eine wichtige Bedeutung hat Beispielsweise werden über den SRF wiederum Gene für Vinculin oder Acta2 exprimiert, was Einfluss auf die Motilität oder auch Adhäsionsfähigkeit von Zellen hat (Baarlink, Wang, &Grosse, 2013).

Baarlink et al. konnten zeigen, dass G-Aktin an das Protein MAL (Megakaryocytic acute leukemia), einen Kofaktor von SRF, bindet und durch die Aktivität von nukleär lokalisierten Forminen, wiederum gelöst werden kann, was letztlich zur Aktivierung von SRF führt. Neu war hier vor allem, dass die Loslösung des G-Aktins von MAL durch

Polymerisierung zu filamentösen Aktinstrukturen im Zellkern, vermittelt durch mDia1 und mDia2, herbeigeführt wurde (Baarlink, Wang, & Grosse, 2013). Dieser dynamische Prozess konnte zum einen durch Stimulation von NIH-3T3 Zellen mit fetalem Kälberserum (Abb. 4a), sowie zum anderen durch die Photoaktivierung von mDia1 und mDia2 ausgelöst werden (Abb. 4b) (Baarlink, Wang, & Grosse, 2013).

## LifeAct-GFP-NLS

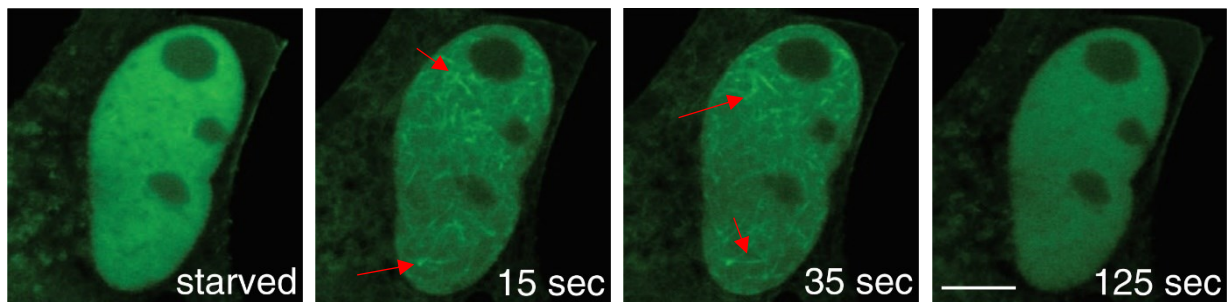


Abb. 4a

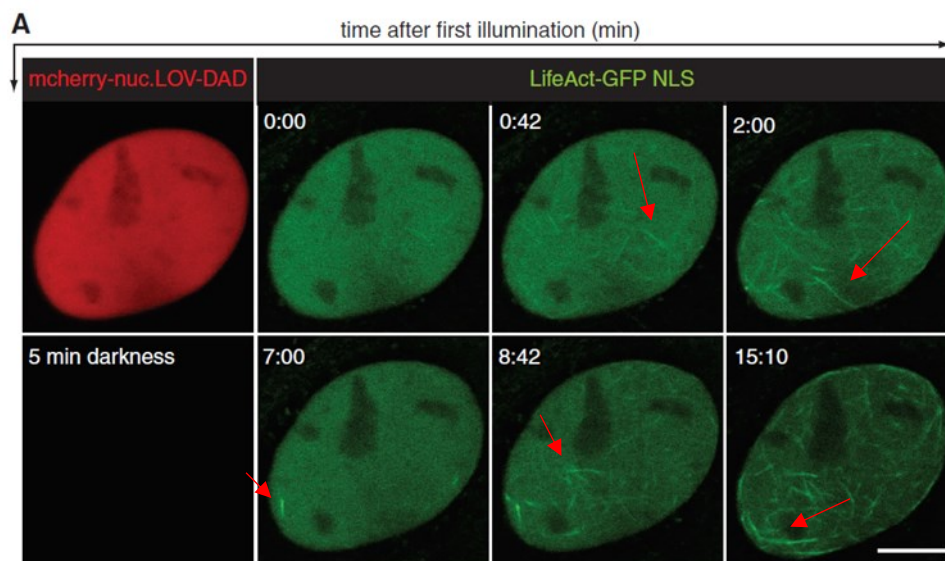


Abb. 4b

Abb. 4: Darstellung eines dynamischen nukleären Aktinnetzwerks in NIH-3T3 Zellen

### Abb. 4a: Serienbilder eine Live-Aufnahme von NIH-3T3 Zellen nach Serum-Stimulation

Die Zellen waren zuvor mit Life-Act transfiziert worden. Das Life-Act wiederum, wurde mit einem grün-fluoreszierenden Protein markiert, welches die Aktinfilamente sichtbar machte. Nach 24 h Starvierung in Serum-freien Medium fand eine Stimulation mit 20% FCS statt. Nach 15 Sekunden, wurden Aktinfilamente im Zellkern sichtbar, die sich nach 125 sec wieder aufgelöst hatten (Baarlink, Wang, & Grosse, 2013).

### Abb. 4b: NIH-3T3 Zellen nach Photoaktivierung von mDia

Die hier verwendeten Zellen exprimierten ein photoaktivierbares LOV-DAD Konstrukt, welches nach Lichtexposition bei einem Spektrum von 400-500nm die selbst-Inhibition von mDia verhinderte und somit zur Bildung eines nukleären Aktinnetzwerks nach Lichtexposition führte (Baarlink et al., 2017).

## 2.4. Nukleäre Aktinfilamente beeinflussen die Chromatinreorganisation während der Mitose

Neben dem Nachweis einer Bildung von nukleären Aktinfilamenten durch Serumstimulation und Photoaktivierung konnte im Jahr 2017 zudem die Existenz von nukleärem F-Aktin zum Ende der Mitose bei NIH-3T3 Zellen durch Baarlink und Plessner et al. nachgewiesen werden (Baarlink et al., 2017). Für selbige Aktinfilamente wurde eine mögliche Funktion bei der Chromatinreorganisation angenommen, welche durch die Verwendung diverser Histon-Marker weiter untermauert werden konnte: Bei bereits vorangegangenen Versuchen zur Visualisierung von nukleären Aktinfilamenten in NIH-3T3 Zellen konnte beobachtet werden, dass sich während der Entstehung von Tochterzellen vermehrt F-Aktin in den Kernen dieser Zellen bildete (Baarlink et al., 2017).

Während filamentöse Aktinstrukturen sowohl in fixierten Präparaten mittels Anfärbung durch Alexa-Fluor 488 Phalloidin sichtbar gemacht wurden, war auch durch Live-Cell Imaging ein Vorhandensein von nukleärem F-Aktin darstellbar (Baarlink et al., 2017). Dabei erschienen diese Filamente einer dynamischen Umstrukturierung zu unterliegen, was zu der Vermutung führte, dass sie eine mögliche Funktion während der Zellteilung innehaben (Baarlink et al., 2017). Zeitlich erfolgte während der G1 Phase die Polymerisierung von Aktin über 60-70 Minuten und mündete während des Eintritts in die Interphase wiederum im Abbau der filamentösen Strukturen (Baarlink et al., 2017). Außer in NIH-3T3 Zellen konnte diese Beobachtung außerdem in MCF10a Brustepithel-Zellen, RPE-1 Retinal pigmented cells und HT180 Fibrosarkom-Zellen gemacht werden (Baarlink et al., 2017).

Um weitere Erkenntnisse über die Rolle der nukleären Aktinfilamente während der G1 Phase zu erhalten, wurde gleichzeitig mit den Filamenten ein Fluoreszenz-markierter Histonmarker (H2B) verwendet, welcher das nukleäre Kompartiment farblich visualisieren kann (Baarlink et al., 2017). Hierbei zeigte sich, dass es während der Polymerisierung von nukleärem Aktin zu einer deutlichen Volumenzunahme des Zellkerns, sowie einer Vorwölbung desselben kommt (Baarlink et al., 2017). Die Anwendung von Zytoskelett-Inhibitoren (Lantraculin B), oder die Verwendung von Zellen mit einer R62D Aktinmutante, welche nicht polymerisieren kann, führten hingegen nicht zu letztgenannten Beobachtungen, was ebenfalls eine Rolle des nukleären Aktins bei diesen Phänomenen nahelegt (Baarlink et al., 2017). Während der durchgeführten Versuche fiel zudem auf, dass sich Aktin während der Mitose auch inzwischen von Chromatinstrukturen befindet (Baarlink et al., 2017). Daraufhin wurde untersucht, ob nukleäre Aktinfilamente möglicherweise einen Einfluss auf den Kondensierungsprozess

des Chromatins haben können (Baarlink et al., 2017). Der bereits genannte Marker H2B kann ebenfalls für die Messung der Dichte von Chromatin verwendet werden und kam aufgrund dessen für die Folgeexperimente zur Anwendung (Baarlink et al., 2017). Zusammengefasst konnte hierbei gezeigt werden, dass wenn die Polymerisierung von nukleärem Aktin beeinträchtigt wird, es zu einer deutlich eingeschränkten Chromatinzugänglichkeit kommt (Baarlink et al., 2017). Da eine Kondensation von Chromatin innerhalb von Zellen zu einer verringerten Transkriptionsaktivität führt, liegt die Vermutung nahe, dass nukleäre Aktinfilamente einen wichtigen Einfluss hinsichtlich der Regulierung der Genexpression in unterschiedlichen Zellen haben könnten (Baarlink et al., 2017).

## 2.5. Die Rolle des nukleären F-Aktins bei DNA-Strangbrüchen

Neueste Forschungsergebnisse legen eine Funktion für nukleäres F-Aktin im Zusammenhang mit DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) des Heterochromatins nahe (Caridi et al., 2018). Kommt es in Zellen zu Doppelstrangbrüchen, besteht die Gefahr einer aberranten Rekombination. Das bedeutet, dass sich nicht-homologe Chromosomen aneinanderlagern, was die Genomstabilität gravierend gefährden und (Caridi et al., 2018) beispielsweise zu Aneuploidien führen kann (Caridi et al., 2018). Um dies zu verhindern, kommt es in betroffenen Zellen zur Verbringung der geschädigten DNA-Abschnitte in die Kernperipherie (Caridi et al., 2018) und damit gleichzeitig zur Begünstigung von Rekombinationen zwischen homologen Chromosomen (Caridi et al., 2018). Durch welche Mechanismen die Verbringung der geschädigten DNA in die Kernperipherie erfolgt, war lange Zeit nicht vollständig geklärt (Caridi et al., 2018). Bekannt ist jedoch, dass sich nukleäres F-Aktin bildet, sobald es zu Doppelstrangbrüchen in Säugerzellen kommt (Caridi et al., 2018).

Wissenschaftler des Department of Molecular and Computational Biology der University of Southern California in Los Angeles erzeugten in Zellen der *Drosophila melanogaster* Doppelstrangbrüche mit Hilfe von ionisierender Strahlung, wodurch eine Abnahme von  $\gamma$ H2Av Foci im Bereich des Doppelstrangbruchs und eine nachfolgende Anreicherung (60 Minuten nach DSB-Initiation) derer in der Kernperipherie zu verzeichnen war (Caridi et al., 2018).  $\gamma$ H2Av bezeichnet eine Histon-Variante (H2Av) welche in Folge von Doppelstrangbrüchen durch Protein-Kinasen phosphoryliert wird und als Marker für Doppelstrangbrüche gilt (Lake et al., 2013).

Nach Applikation des Aktin-Polymerisierungshemmers Lantraculin B (LatB) zeigte sich eine Anreicherung des  $\gamma$ H2Av vor allem im Bereich des Heterochromatins, anstatt

zunehmend in der Kernperipherie (Caridi et al., 2018). Das Gen-Silencing mittels RNA Interferenz des bekannten Aktin-Nukleators Arp 2/3 (s. Kapitel 2.2. „Aktin-bindende Proteine“) zeigte ähnliche Ergebnisse wie nach LatB Applikation (Caridi et al., 2018). Des Weiteren wurde mittels GFP-tagged-Actin-Chromobody (versehen mit NLS-Sequenz) beobachtet, dass nach Anwendung von ionisierender Strahlung Aktinfilamente entstehen, welche die Heterochromatindomäne umgeben und die Kernperipherie erreichen (Caridi et al., 2018). Diese Filamente bildeten sich gleichzeitig mit der Verbringung von geschädigter DNA in die Peripherie, wirkten strukturell dynamisch und verschwanden im Anschluss an die Relokalisation der geschädigten DNA in die Peripherie (Caridi et al., 2018). Darüber hinaus konnte in Zeitrafferexperimenten gezeigt werden, dass DNA-Reparaturproteine (in diesem Fall Mdc1) auf diesen nukleären Aktin-Filamenten in die Peripherie transportiert zu werden scheinen (Caridi et al., 2018). Ebenfalls wurde wie in dieser Arbeit R62D-Aktin in Zellen verwendet, was zu defizitärer Relokalisation von DNA führte (Caridi et al., 2018). Auch Myosinen wurde eine Rolle bei beschriebenen Relokalisierungsprozess in Kommunikation mit Aktinfilamenten zugeschrieben (Caridi et al., 2018), was wiederum stark an das Zusammenspiel von Aktin und Myosin als Bestandteile des Zytoskeletts erinnert.

Hieraus wurde geschlussfolgert, dass nukleäre Aktinfilamente benötigt werden, um geschädigte DNA des Heterochromatins in die Kernperipherie zu transportieren (Caridi et al., 2018), was wiederum einen äußerst dynamischen Prozess innerhalb von Zellen darstellt.

Eine andere US-amerikanische Forschungsgruppe konnte ebenfalls Hinweise für die Beteiligung von nukleären Aktinfilamenten bei der homologen Rekombination nach Doppelstrangbrüchen generieren (Schrack et al., 2018). Hierbei wurde gezeigt, dass die Proteine WASP (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein) und Arp 2/3 (wird durch WASP aktiviert) (Schrack et al., 2018) zu einer Nukleation von Aktinmonomeren und darauf aufbauender Filamentbildung im Rahmen einer homologen Rekombination führen (Schrack et al., 2018).

## 2.6. Der Einfluss des Steroidhormons Östrogen auf die Genexpression

Östrogene zählen zu den Steroidhormonen und haben auf unterschiedlichste Art und Weise Einfluss auf den Organismus (Lipovka & Konhilas, 2016). Als wichtige Östrogene sind Oestron (E1), 17- $\beta$ -Estradiol (E2) und Oestriol (E3) zu nennen (Lipovka & Konhilas,



2016). In dieser Arbeit wurde sich vor allem auf das in der prämenopausalen Phase dominante (Lipovka & Konhilas, 2016) Estradiol und dessen Einfluss auf die Transkription von für unterschiedliche zelluläre Prozesse relevante Gene konzentriert.

Östrogene können auf vielfältige Art und Weise die Transkription von Genen beeinflussen (Lipovka & Konhilas, 2016). Diese Beeinflussung kann unterteilt werden in genomische und nicht-genomische Signalwege (Lipovka & Konhilas, 2016). Erfolgt durch Östrogene eine genomische Signalwirkung, so kommt es zunächst zur Bindung des Östrogens an Östrogenrezeptoren (Lipovka & Konhilas, 2016). Hierbei sind insbesondere die Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  zu nennen (Lipovka & Konhilas, 2016). Diese Rezeptoren gehören zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren und bestehen aus mehreren funktional wichtigen Untereinheiten, wie einer N-terminalen Domäne (NTD), eine DNA-bindenden Domäne (DBD) und einer Liganden-bindenden-Domäne (LBD) (Lipovka & Konhilas, 2016). Über die DBD kann eine Bindung von Östrogen-responsiven-Elementen (Estrogen-response-elements, EREs) erfolgen, welche sich räumlich nahe bei Promotoren oder Enhancer-Regionen befinden und in der Lage sind für die Transkription essentielle Koaktivatoren zu rekrutieren (Lipovka & Konhilas, 2016). Im Bereich der N-terminalen und Liganden-bindenden Domäne der Rezeptoren existieren sogenannte Activation-Function-Domains (AFs), welche die transkriptionale Aktivität der Rezeptoren regulieren können (Lipovka & Konhilas, 2016). Des Weiteren besitzen Östrogenrezeptoren ein nuclear-localization-signal (NLS), welches nach Ligandenbindung offengelegt wird und eine Translokation der Rezeptoren in den Zellkern ermöglicht (Lipovka & Konhilas, 2016). In Bezug auf die genomische Signalwirkung von Östrogen können Östrogenrezeptoren als Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden, da sie nach der Bindung von Östrogen eine Konformationsänderung durchlaufen und letztendlich in den Zellkern gelangen, wo es dann mit Hilfe ihrer oben genannten Domänen zur Aktivierung oder Hemmung der Transkription von Genen kommt (Lipovka & Konhilas, 2016). Insbesondere die Aktivierung der RNA-Polymerase II ist hier als wichtiger Schritt zu benennen (Lipovka & Konhilas, 2016). Eine Besonderheit ist zudem, dass das Vorhandensein von EREs für die Transkription nicht zwingend erforderlich ist (Lipovka & Konhilas, 2016). In diesem Fall kommt es zu Protein-Protein-Interaktionen zwischen Östrogenrezeptoren und anderen Transkriptionsfaktoren (Lipovka & Konhilas, 2016). Beispiele für Gene bei denen dies geschieht sind das FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homologue (v-Fos), das Protoonkogen Jun oder auch der Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) (Lipovka & Konhilas, 2016).

Wenn Östrogen über nicht-genomische Signalwege wirksam wird, geschieht dies meist über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie den G-protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER1) und diverse Variationen von ER $\alpha$  und ER $\beta$  (Lipovka & Konhilas, 2016). Im

Gegensatz zu klassischen Östrogenrezeptoren weist der GPER1 eine Transmembrandomäne auf (Lipovka & Konhilas, 2016). Bindet Östrogen an solche Rezeptoren, kommt es zur direkten Interaktion dieser mit anderen Proteinen, was zur Aktivierung von Kinasen, Phosphatasen oder Ionenströmen über die Zellmembran führt (Lipovka & Konhilas, 2016). Beispiele für den Effekt von nicht-genomischer Östrogeneinwirkung sind die Stimulation von Adenylatcyclasen-Aktivität, cAMP Produktion oder Aktivierung von MAP-Kinasen (Lipovka & Konhilas, 2016). Dennoch ist auch über den nicht-genomischen Signalweg eine Beeinflussung der Transkription von bestimmten Genen möglich (Lipovka & Konhilas, 2016). Zum Beispiel kann neben der direkten Transkription von IGF-1 (Insulin-like-growth-factor 1) durch ER $\alpha$  Bindung an EREs auch eine Aktivierung von MAP Kinasen erfolgen, die die ER $\alpha$ -medierte Transkription dieses Gens regulieren (Lipovka & Konhilas, 2016).

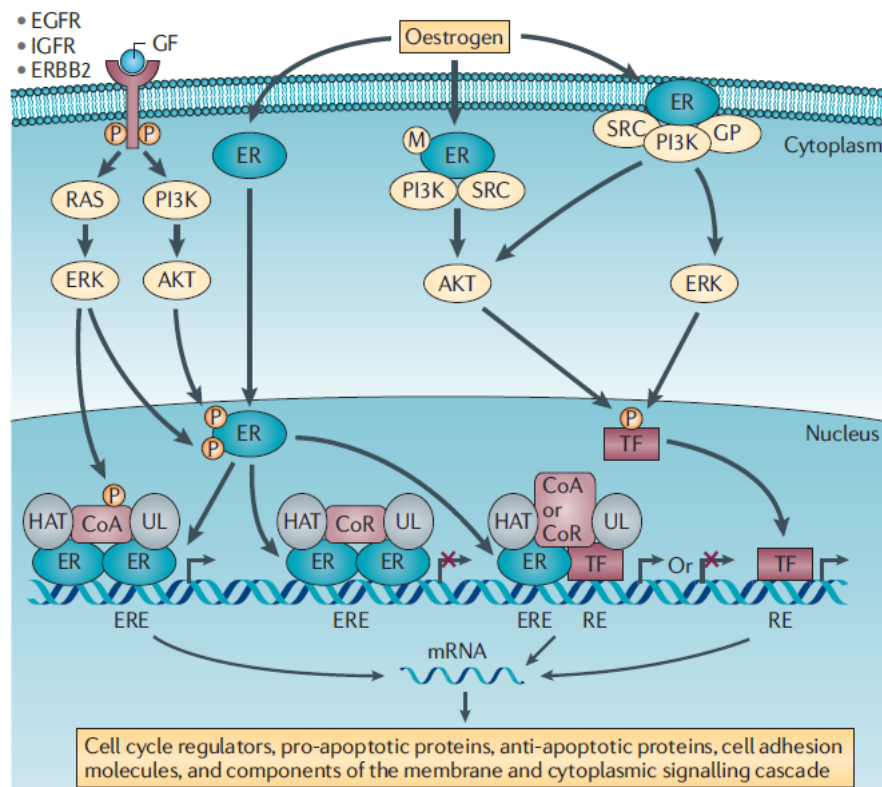


Abb. 5

### Abb. 5: Übersicht über die molekularen Effekte des Östrogenrezeptors

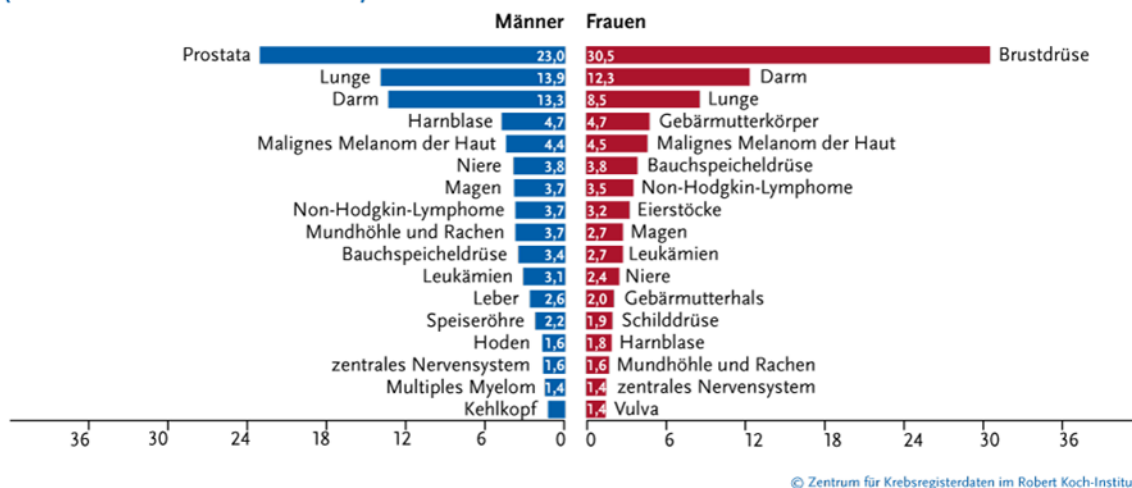
Gezeigt ist die Bindung des Steroidhormons Östrogen an Östrogenrezeptoren, welche dimerisieren und dann mit EREs (estrogen-responsive-elements) interagieren, die im Anschluss an Proteinkomplexe binden, die entweder eine Gen-Transkription aktivieren (CoA) oder unterdrücken (CoR). Auch eine Interaktion mit anderen DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren (TF) ist dargestellt. Über nicht-genomische Signalwege können methylierte ERs (mER) direkt mit Proteinkinasen interagieren, welche dann Transkriptionsfaktoren phosphorylieren können. Andere gezeigte Rezeptoren (EGFR, IGFR und ERBB2) können ERs phosphorylieren (über Kinasen) und somit aktivieren. HAT (Histonacetyltransferase) und UL (Ubiquitin-Ligase) haben co-regulatorische Effekte bei der Gen-Transkription (Thomas & Gustafsson, 2011).

## 2.7. Auswirkungen der Östrogensignalwirkung bei Mammakarzinomen

Das Mammakarzinom stellt in Deutschland die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau dar (Tab. 1) (Robert Koch-Institut e.V., Die Gesellschaft der epidemiologischen

Krebsregister in Deutschland, 2015). Hinsichtlich der Proliferation, Migration und auch der Metastasierung und Prognose bei Mammakarzinomen besitzt Östrogen eine hohe Relevanz (Lipovka & Konhilas, 2016). Eine Unterteilung von Mammakarzinomen erfolgt unter anderem in Hormonrezeptor-positive und -negative Karzinome (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2018). Dabei werden sowohl der Östrogenrezeptor- als auch der Progesteronrezeptorstatus berücksichtigt (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2018). Eine weitere Kategorie durch die Mammakarzinome klassifiziert werden, ist ihr HER2neu-Status (human epidermal growth factor receptor 2) (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2018). Ein positiver Her2/neu-Status bedingt meist eine schlechtere Prognose (Nasrazadani et al., 2018) (Baselga et al., 2017), bietet jedoch die Möglichkeit einer Therapie mittels monoklonalem Antikörper (Trastuzumab) (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2018). Mammakarzinome, welche Hormonrezeptor-positiv sind, gehen meist mit einer günstigeren Prognose, verglichen mit Hormonrezeptor-negativen Karzinomen, einher (Nasrazadani et al., 2018). Die (über-) exprimierten Rezeptoren können dabei als Zielstrukturen von antihormonellen Therapien dienen (Nasrazadani et al., 2018). Häufig verwendete antihormonell-wirksame Chemotherapeutika sind beispielsweise selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren wie Tamoxifen (antagonistische Wirkung bei Mammakarzinomen, agonistische Wirkung bei anderen Zielgeweben, z.B. Knochen) (Graefe, Lutz, & Bönisch, 2011, S. 391-392), Aromatase-Hemmer wie Anastrozol (Hemmung der Östrogensynthese) (Graefe, Lutz, & Bönisch, 2011, S. 392) oder auch GnRH-Analoga (Gonadotropin-releasing-Hormone) wie Goserelin (Desensibilisierung des GnRH-Rezeptors, Verminderung dessen Aktivität) (Graefe, Lutz, & Bönisch, 2011, S. 353). Eine deutlich schlechtere Prognose haben sogenannte triple-negative Mammakarzinome (Lipovka & Konhilas, 2016), da hier durch das Fehlen von entsprechenden therapeutischen Zielen (Hormonrezeptoren, Her2/neu), die Handlungsmöglichkeiten deutlich eingeschränkt sind (Liedtke, 2017). Neben der Expression von Hormonrezeptoren, oder des Her2/neu sind des Weiteren das Tumorstadium, das Vorhandensein von Metastasen, das Alter der Patienten sowie auch Proliferationsmarker wie Ki-67 von maßgeblicher Bedeutung für die Prognose (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2018).

Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014  
(ohne nicht-melanotischen Hautkrebs)



Tab. 1

**Tab. 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebserkrankungen in Deutschland 2014**

Zu erkennen ist, dass maligne Erkrankungen der Brustdrüse mit Abstand den größten Anteil an Tumorerkrankungen bei Frauen in Deutschland ausmachen (Robert Koch-Institut e.V., Die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2015).

Für Östrogen sind zahlreiche die Progression des Mammakarzinoms fördernde Eigenschaften nachgewiesen worden (Lipovka & Konhilas, 2016). Unter anderem können Transkriptionsfaktoren, wie Ets1 (v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homologue 1) mit dem Östrogenrezeptor  $\alpha$  Komplexe bilden und so zur Transkription von Genen führen, welche die Proliferation von Tumorzellen nach Östrogenstimulation anregen (Lipovka & Konhilas, 2016). Auch andere molekulare Stimulatoren des Mammakarzinomwachstums werden durch Östrogen vermehrt transkribiert (Lipovka & Konhilas, 2016). Darunter sind insbesondere Hes-6 (bHLH transcription factor 6), PTGES (Prostaglandin E Synthase), ALP (Alkaline-Phosphatasen), sowie das LRP16 Gen zu nennen (Lipovka & Konhilas, 2016). Auch die Metastasierung von Mammakarzinomen kann durch Östrogene maßgeblich mit beeinflusst werden (Lipovka & Konhilas, 2016). Dies sei beispielsweise über eine vermehrte Transkription des Gens für MRTFA (Myocardin-related factor A, **Synonym: MAL**) der Fall (Lipovka & Konhilas, 2016), (Zhang et al., 2013) welcher, wie bereits vorab erwähnt, ebenfalls durch dynamische Prozesse der nukleären Aktinfilamentbildung beeinflusst wird (Baarlink, Wang, & Grosse, Nuclear Actin Network Assembly by Formins Regulates the SRF Coactivator MAL, 2013). Ebenfalls ist bekannt, dass neben einer

Überexpression von Ezrin, einem Aktin-bindenden Protein, in metastasierten Mammakarzinomen (Lipovka & Konhilas, 2016) durch Östrogen eine vermehrte Phosphorylierung dieses Proteins hervorgerufen werden kann, was zu einer vermehrten Mobilität von Brustkrebszellen führt (Lipovka & Konhilas, 2016). Weitere Beispiele, die zeigen wie Östrogen sich auf das Wachstum und die Metastasierungstendenz von Mammakarzinomen auswirkt, sind in Abb. 6 dargestellt.

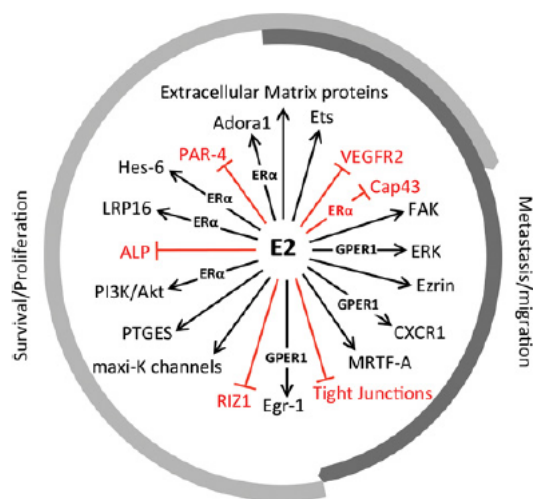


Abb. 6

### Abb. 6: Östrogen-Wirkungen auf Proliferation und Metastasierung von Tumorzellen

Darstellung des Einflusses von Östrogen auf unterschiedliche molekulare Initiatoren des Tumorzellwachstums und/oder Metastasierung. Dabei ist aufgezeigt, welche Effekte durch ERα und welche durch den G-Protein gekoppelten Rezeptor GPER1 vermittelt werden. Die schwarzen Pfeile zeigen einen stimulierenden und die roten Pfeile einen hemmenden Effekt des Östrogens auf die unterschiedlichen Effektoren (Lipovka & Konhilas, 2016).

Neben den durch Östrogen vermittelten Effekten, welche onkogene Eigenschaften zeigen, weist Östrogen in Einzelfällen auch gegenteilige Effekte auf (Lipovka & Konhilas, 2016). So kann Östrogen die Expression von GD3 Synthasen hemmen (Lipovka & Konhilas, 2016), welche durch Überexpression in Mammakarzinomzellen die Migration und Proliferation der Tumorzellen verstärken (Lipovka & Konhilas, 2016). Auch die

Apoptose von Tumorzellen kann durch Östrogen in höheren Konzentrationen initiiert werden (Lipovka & Konhilas, 2016).

## 2.8. Nukleäre Aktinfilamente als möglicher dynamischer Bestandteil der Genexpression und ihrer Regulierung

Die Expression von Genen innerhalb von Zellen unterliegt äußerst komplexen und derzeit noch nicht vollständig verstandenen Abläufen. Ob und wie ein Gen exprimiert wird, unterliegt zahlreichen regulatorischen Aspekten. (Dekker & Misteli, 2015).

Darüber hinaus sind unterschiedlichste, mitunter dynamische Prozesse im Kern einer Zelle notwendig, damit in Chromosomen befindliche Informationen des Erbgutes korrekt erfasst und letztendlich auf Proteinebene umgesetzt werden können. (Dekker & Misteli, 2015) Zu diesen zählen etwa intra- und interchromosomale Interaktionen (Dekker & Misteli, 2015). Bezüglich dieser ist es von Bedeutung zu wissen, dass die Expression von Genen diverser regulatorischer Elemente bedarf, beispielsweise in Form von Transkriptionsverstärkern (Enhancern), welche die Genexpression forcieren oder auch sogenannte Silencer, welche eine gegenteilige Funktion haben (Dekker & Misteli, 2015). Sowohl Transkriptionsverstärker als auch Silencer sind Abschnitte der DNA, die sich durch eine definierte Basenabfolge unterscheiden (Dekker & Misteli, 2015). Transkriptionsverstärker wirken durch Beeinflussung der Interaktion zwischen Promotor und Transkriptionskomplex (Dekker & Misteli, 2015). Die Entfernung von Transkriptionsverstärkern zu ihrem eigentlichen Wirkungsort, also der Promotorregion, ist höchst variabel (Dekker & Misteli, 2015). Dennoch ist es möglich, dass sogar über mehrere Megabasenpaare entfernte Transkriptionsverstärker mit Promotoren interagieren können und eine Genexpression forciert wird (Dekker & Misteli, 2015).

Dies ist beispielsweise der Fall bei der Expression des SonicHedgehog Gens (Dekker & Misteli, 2015). Damit diese Interaktion stattfinden kann, kommt es in der entsprechenden DNA-Sequenz durch Veränderung der Architektur des Chromatins zur Ausbildung von Schleifen (Loops), wodurch sich Transkriptionsverstärker und Promotor räumlich annähern können (Dekker & Misteli, 2015). Somit können verschiedene für die Transkription von Genen essenzielle Elemente innerhalb eines Chromosoms in Kontakt kommen, was als *intrachromosomale* Interaktion bezeichnet wird (Dekker & Misteli, 2015).

*Interchromosomale* Interaktionen beschreiben hingegen, dass regulatorische Elemente eines Chromosoms Effekte auf die Expression von auf anderen Chromosomen

befindlichen Genen haben können (Dekker & Misteli, 2015). Dieser Umstand konnte zuerst zwischen zueinander homologen Chromosomen beschrieben werden, jedoch auch zwischen nicht-homologen Chromosomen sind interchromosomale Interaktionen nachgewiesen worden (Dekker & Misteli, 2015). Ein bekanntes Beispiel für interchromosomale Interaktionen ist die X-Inaktivierung in Embryonen von weiblichen Säugern über *Xist*-RNA (Dekker & Misteli, 2015). Hierbei erfolgt die Inaktivierung eines der beiden Chromosomen durch eine spezielle RNA (X-inactive specific transcription), die unter Zuhilfenahme von Silencern die Expression von Genen des betreffenden X-Chromosoms verhindert (Dekker & Misteli, 2015). Untersuchungen mittels FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) sowie Live-Cell-Imaging-Versuche konnten zeigen, dass die Loci der X-Chromosomen, auf denen das Gen für *Xist* lokalisiert ist, direkt miteinander zu interagieren scheinen (Dekker & Misteli, 2015). Währenddessen wird auf einem Chromosom die Expression eines Gens (*Tsix*) welches wiederum die Expression von *Xist* hemmt, herunterreguliert, was in einer verstärkten *Xist* Expression resultiert und schließlich zur Inaktivierung des betreffenden X-Chromosoms führt (Dekker & Misteli, 2015). Wie es zum **dynamischen Prozess** der Annäherung der miteinander interagierenden Chromosomen, sowie zu der Herunterregulierung von *Tsix* kommt, ist bisher nicht bekannt (Dekker & Misteli, 2015).

Interchromosomale Interaktionen konnten ebenfalls bei der Expression von Östrogen-responsiven Genen in MCF-7 Zellen nach Östrogengabe nachgewiesen werden (Hu et al., 2008). Gezeigt werden konnte dies für die Gene TFF1 und GREB1, welche jeweils auf Chromosom 21 und Chromosom 2 lokalisiert sind (nachgewiesen durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) (Hu et al., 2008). Östrogen bewirkte hierbei die Annäherung der beiden Chromosomen, welche zuvor an unterschiedlichen Stellen innerhalb des Zellkerns lokalisiert waren (Hu et al., 2008). Östrogen scheint demnach eine Wirkung auf die nukleäre Architektur und daraus resultierenden dynamischen Prozessen innerhalb des Zellkerns zu haben (Hu et al., 2008).

Hu et al. konnten innerhalb von Brustepithelzellen nicht-polymerisiertes G-Aktin detektieren (Hu et al., 2008) und behandelten daraufhin die Zellen zunächst mit Östrogen als auch mit Substanzen, welche nachgewiesenermaßen die Polymerisierung von Aktin hemmen (Hu et al., 2008). Dies hatte zu Folge, dass keinerlei interchromosomale Interaktionen in den genannten Zellen mehr nachgewiesen werden konnten (Hu et al., 2008) und auch die Östrogen-induzierte Expression von TFF1 und GREB1 nicht mehr erfolgte. (Hu et al., 2008). Dies liegt die Vermutung nahe, dass Aktin eine entscheidende



Bedeutung bei der dynamischen Annäherung der Chromosomen zueinander und somit auch bei der Genexpression zu haben scheint.

Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass Aktin in anderen Zelllinien direkt funktionell mit transkriptionellen Prozessen assoziiert ist. Zu nennen ist diesbezüglich die Fähigkeit des Aktins an RNA Polymerasen zu binden (Percipalle & Visa, 2006). Eine Anwendung von Antikörpern gegen Aktin führt dabei zu einer reduzierten Aktivität der Polymerasen (Percipalle & Visa, 2006). Auch die Aktivierung von ATPasen innerhalb von Chromatin Remodelern wird unter anderem durch Aktin vermittelt (Percipalle & Visa, 2006).

Anhand der oben beschriebenen wissenschaftlichen Ergebnisse kann demnach festgehalten werden, dass Aktin nicht nur ein zentraler Bestandteil des Ablaufes der Genexpression, sondern auch auf funktional-vielfältige Art und Weise in diese involviert ist.

## 2.9. Fragestellungen der Arbeit

Östrogen ist ein schon sehr lang bekannter Einflussfaktor bei der Entstehung von Mammakarzinomen, sowie wichtiges Ziel von antihormonellen Therapien. Mehrfach konnte gezeigt werden, dass Östrogen auf transkriptioneller Ebene aktiv wirkt und weitreichende Veränderungen in Zellen bewirken kann.

Die Entstehung und Funktion von dynamischen nukleären Aktinnnetzwerken in menschlichen Tumorzellen könnten dazu beitragen, den Einfluss von Östrogen bei der Expression von für Proliferation, Apoptose und Migration wichtigen Genen besser zu verstehen und in Zukunft neue Wege für Mammakarzinom-Therapien zu ebnen. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob ein filamentöses Aktinnetzwerk in MCF-7 Brustkrebszellen vorhanden ist und ob Östrogen ein Regulator dieses Prozesses ist. Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet.

1. Kommt es in verschiedenen Tumorzelllinien mit Mutationen in wichtigen Onkogenen zur Ausbildung des nukleären Aktinnetzwerks?
2. Wird die Ausbildung des nukleären Aktinnetzwerks in MCF-7 Zellen durch Östrogen reguliert?

3. Hat das Aktin-bindende Protein Cofilin einen Einfluss auf die Ausbildung des nukleären Aktinnetzwerks in MCF-7 Zellen?
4. Verändert die dysfunktionale R62D-Aktinmutante die Östrogen-abhängige Regulation des nukleären Aktinnetzwerks in MCF-7 Zellen?
5. Inwieweit wird die Expression von Genen, die durch Östrogen transkriptionell reguliert werden, durch die Expression der R62D-Aktinmutante in MCF-7 Zellen beeinflusst?

### 3. Materialien und Methoden

Substanz	Hersteller
Acrylamid (30 %) -Bisacrylamid (0,8%)	Roth, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 Phalloidin	Invitrogen, Deisenhofen
Alexa Fluor 647 Phalloidin	Invitrogen, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Chromobody	ChromoTek, Planegg
DAPI	Invitrogen, Deisenhofen
DMEM (Phenolred free)	Capricorn, Ebsdorfergrund
Doxycyclin	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Estradiol	Sigma Aldrich, Steinheim
FCS (Fetal Calfserum)	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd 37%	Bio-Rad, München
Glutaraldehyd 25%	Sigma Aldrich, Steinheim
Glucose	Roth, Karlsruhe
iQ SYBR-Green Supermix	Bio-Rad, München
Kontroll-siRNA	Qiagen, Hilden
Laemmli-Puffer	Merck, Darmstadt
Lipofectamine RNAiMAX	Life Technologies, Darmstadt
Natrium Borohydrat 1mg/ml	Roth, Karlsruhe
OptiMEM	Invitrogen, Karlsruhe
PBS (phosphate buffered saline)	PAA/GE Healthcare, Cölbe

Primärantikörper Östrogenrezeptor $\alpha$	Qiagen
Primärantikörper Cofilin	Qiagen
RNase freies Wasser	Promega, Mannheim
RT-PCR Primer Bcl2	Biomol, Hamburg
RT PCR Primer Cofilin	Biomol, Hamburg
RT-PCR Primer Myc	Biomol, Hamburg
RT-PCR Primer TP53	Biomol, Hamburg
RT PCR Primer BRCA1	Biomol, Hamburg
RT PCR Primer Rab17 #1	Biomol, Hamburg
RT PCR Primer Rab17 #2	Biomol, Hamburg
RT PCR Primer FOXA1 #1	Biomol, Hamburg
RT PCR Primer FOXA1 #2	Biomol, Hamburg
RT PCR Primer v-Jun	Biomol, Hamburg
RT PCR Primer v-Fos	Biomol, Hamburg
siRNA Östrogenrezeptor $\alpha$	Qiagen, Hilden
N,N,N',N'-tetramethyl-ethan-1,2-diamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Capricorn, Ebsdorfergrund
WST Reagenz	Roche, Basel

Tab. 2

---

**Tab. 2: Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien**

---

### 3.1. Gentechnische Methoden

#### 3.1.1. Real Time quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Um die Expression eines Gens auf RNA-Niveau zu ermitteln, wurden für diese Arbeit qPCR Experimente durchgeführt. Bei der Durchführung von qPCRs wird zunächst wie bei herkömmlichen PCRs eine Vervielfältigung von bestimmten Nukleinsäureabschnitten vorgenommen, welche anschließend unter Verwendung eines fluoreszierenden Farbstoffes (SYBRGreen) quantifiziert werden. Die Messung der Menge an

Nukleinsäuren erfolgt dabei indirekt anhand der Fluoreszenz-Intensität des Farbstoffes, welcher die Fähigkeit hat, sich in die dsDNA einzulagern.

Zielgen	Primer	Sequenz ( 5'→ 3' )
<b>Bcl2</b>	Fwd	AGATGGGAACACTGGTGGAG
	Rev	CTTCCCCAAAAGAAATGCAA
<b>Myc</b>	Fwd	GCCCAGTGAGGATATCTGGA
	Rev	ATCGCAGATGAAGCTCTGGT
<b>TP53</b>	Fwd	GGCCCACTTCACCGTACTAA
	Rev	GTGGTTTCAAGGCCAGATGT
<b>BRCA1</b>	Fwd	AACCCCTTACCTGGAATCTG
	Rev	TCCCTGCTCACACTTTCTTC
<b>Rab17 (Set #1)</b>	Fwd	GTACGACATCACCAGGAAGG
	Rev	GTAGCTCTTGGGCCACTGTA
<b>Rab17 (Set #2)</b>	Fwd	TCTTCACAAAGGTGGTGGAT
	Rev	CCTGAAGTAGAGGTGGCAGA
<b>FOXA1 (Set #1)</b>	Fwd	ACCCCCACTACTCCTTCAAC
	Rev	TAGGACGGGTCTGGAATACA
<b>FOXA1 (Set #2)</b>	Fwd	GAAGATGGAAGGGCATGAAA
	Rev	GCCTGAGTTCATGTTGCTGA
<b>v-Jun</b>	Fwd	TCCCCTAACCTCTTTTCTGC
	Rev	AACATCGCACTATCCTTTGG
<b>v-Fos</b>	Fwd	CAACTTCATTCCCACGGTCA
	Rev	TGGCAATCTCGGTCTGCAAA
<b>Cofilin</b>	Fwd	AGGTGCGTAAGTCTTCAACG
	Rev	GATCCTCCTTCTTGCTCTCC

Tab. 3

**Tab. 3: Verwendete Primerpaare**

Pro Primer wurde ein Mix aus Forward- und Reverse-Primer (Endkonzentration 5 µM) sowie 90 µl PCR-Wasser (RNase-frei) hergestellt. Ein PCR Ansatz umfasste 1 µl Primerpaar-Mix, 9 µl PCR-Wasser, 12,5 µl SYBRGreen (Fluoreszenzfarbstoff) und 2,5 µl cDNA (Verdünnung 1:5).

Schritt	Temperatur in °C	Zeit
Initiale Denaturierung	95	3 Min
Denaturierung	95	10Sek
Hybridisierung	60 (für 40 Zyklen)	30 Sek
Extension	72	30 Sek
Finale Extension	95	2 Min
Schmelzkurve	55 → 95	10 Sek

Tab. 4

Tab. 4: Einstellungen des verwendeten qPCR-Programms

## 3.2. Zellbiologische Methoden

### 3.2.1. Zellkultur

Die Kultivierung der für diese Arbeit verwendeten Zellen erfolgte in Wachstumsmedium, welchem fetales Kälberserum (FCS) mit einer Endkonzentration von 10% zugesetzt worden war. Für MCF-7 Zellen wurde Phenolrot freies Nährmedium benutzt, da Phenolrot eine geringe Östrogenwirkung in diesen Zellen auslöst (Berthois et al., 1986). Für die Serumstimulationsversuche wurden adhärent wachsende Tumorzellen nach Erreichen einer definierten Konfluenz mittels Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gereinigt und anschließend mit Trypsin/EDTA Lösung bei 37°C inkubiert und in Lösung gebracht. Die Dauer der Inkubation in Trypsin/EDTA Lösung variierte hierbei innerhalb der unterschiedlichen Tumorzelllinien geringfügig. Um eine adäquate Lösung von MCF-7 Zellen zu erzielen, wurde eine Inkubationszeit von drei Minuten benötigt. Anschließend erfolgte die Ermittlung der für die Experimente notwendigen Zellzahl unter zur Hilfenahme einer Neubauer-Zählkammer und eines Lichtmikroskops.

### 3.2.2. **Stimulationsversuche mit diversen Tumorzelllinien**

Für die durchgeführten Experimente wurden diverse Zellmengen getestet. Bewährt haben sich für MCF-7 Zellen Mengen von 60.000 bis 100.000 Zellen pro Präparat. Ausgesät wurden die entsprechenden Zellmengen auf zuvor unter mit UV-Licht behandelten Deckgläsern ( $\varnothing=24\text{mm}$ ). Diese waren vor Zellkontakt in 6-Well Platten verbracht worden. Nach Aussaat der Zellen wurden die Wells der verwendeten Platten mit Nährmedium und 10%FCS auf 2 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Am Folgetag wurde die Starvierung der Zellen zunächst mit 0,5% FCS enthaltendem Nährmedium (Starvierungsmedium) für 24 h durchgeführt. Bei wiederholter Durchführung dieser Experimente wurde für MCF-7 Zellen eine optimale Starvierungszeit von 48 h bei FCS-freiem Nährmedium ermittelt.

Nach Ende der Starvierungszeit erfolgte die Stimulation der Zellen mittels 20% FCS enthaltendem Nährmedium (Stimulationsmedium). Hierfür wurde das Starvierungsmedium abgesaugt und das Stimulationsmedium für 20 Sekunden hinzugefügt. Unmittelbar danach wurde eine von zwei Fixierlösungen (Lösung A) bestehend aus 0,5% Triton und 0,25% Glutaraldehyd verdünnt mit Cytoskeletonbuffer (CSK) für 60 Sekunden auf die Proben pipettiert. Nach Ablauf der Zeit wurde Lösung A aus den Wells entfernt und durch eine zweite Fixierungslösung (Lösung B), bestehend aus 2% Glutaraldehyd, verdünnt mit CSK, ersetzt. Lösung B wurde für 15 Minuten auf den einzelnen Proben belassen. Nachfolgend erfolgte ein dreimaliges Reinigen der Proben mit CSK für jeweils zwei Minuten. Anschließend wurde 1mg/ml Natriumborohydrat ( $\text{NaBH}_4$ ) in die Wells pipettiert und dort für zehn Minuten belassen. Dies diente dazu die Autofluoreszenz des verwendeten Phalloidins zu reduzieren, um später eine bessere Qualität der mikroskopischen Aufnahmen zu ermöglichen. Im weiteren Verlauf wurde das Natriumborohydrat entfernt und die Zellen erneut intensiv mit CSK gewaschen.

Für das Anfärben der Zellen wurde Alexa Fluor 488 Phalloidin verwendet. Bei Phalloidin handelt es sich um ein Derivat des Phallotoxins (Melak, Plessner, & Grosse, 2017), einem Gift aus Knollenblätterpilzen, welches eine hohe Bindungsaffinität zu F-Aktin aufweist (Melak, Plessner, & Grosse, 2017). Für die Untersuchung von Aktinstrukturen wird fluoreszierendes Phalloidin verwendet, welches unterschiedliche farbliche Signale generieren kann. Das hier verwendete Alexa Fluor 488 weist ein grün-fluoreszierendes Signal auf, wohingegen ein in anderen Versuchen verwendetes Phalloidin (647) durch ein rotes Signal gekennzeichnet ist. Zum Anfärben der Zellen wurde das Phalloidin auf 1:300 verdünnt und die Zellen damit für 30 Minuten an einem lichtgeschützten Ort inkubiert.

Nach Ablauf der Zeit wurden die Deckgläser mit den Zellen kurz mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend auf Objektträger verbracht, wobei sie mit Mounting Medium fixiert wurden. Die Objektträger wurden anschließend über Nacht gekühlt aufbewahrt. Die mikroskopische Untersuchung der Proben erfolgte am Folgetag.

Für die Stimulationsversuche mit Östrogen wurde zunächst analog zu den einfachen Stimulationsversuchen vorgegangen. Nach 24 h Starvierungszeit wurde Östrogen in unterschiedlichen Konzentrationen ( $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M und  $10^{-12}$  M) mit FCS-freiem Nährmedium für 24 h inkubiert, bevor am Folgetag eine Fixierung und Färbung der Präparate wie oben beschrieben folgte.

### 3.2.3. Wachstumsanalysen mittels WST-Reagenz

WST (Water soluble tetrazolium) Assays werden verwendet, um die Größe von Zellpopulationen zu messen. Dabei wird die Fähigkeit der Zellen das Tetrazoliumsalz (rot) in Formazan (orange) mittels mitochondrialer Dehydrogenasen chemisch umzusetzen (Reduktion) gemessen (Sigma-Aldrich, 2018) (s. Abb. 7).

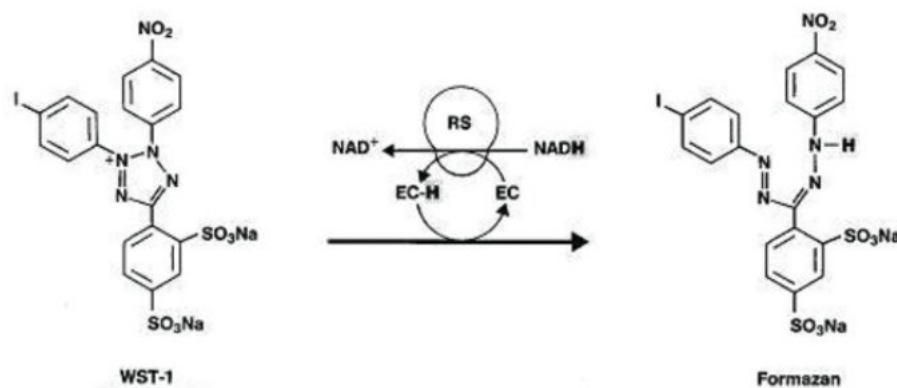


Abb. 7

#### **Abb. 7: Das lösliche Tetrazoliumsalz (WST-1) wird mittels mitochondrialer Enzyme zu Formazan reduziert**

Formazan wird aufgrund eines sich unterscheidenden Absorptionsmaximums spektralphotometrisch nachgewiesen (Sigma-Aldrich, 2018).

Grundlage hierfür stellt eine intakte Atmungskette der Zellen dar, die ausschließlich bei vitalen Zellen vorhanden ist. Für die Evaluierung des chemischen Umsatzes von

Tetrazolium wurden spektralphotometrische Messungen mit Hilfe eines ELISA-Readers durchgeführt.

Um die Proliferation von MCF-7 Zellen bei unterschiedlichen Konditionen zu messen, wurden die Zellen zunächst in 96-Well Platten ausgesät. Dabei wurden die einzelnen Proben gemäß Abb. 8 jeweils horizontal in die 96-Well Platte ausgesät.

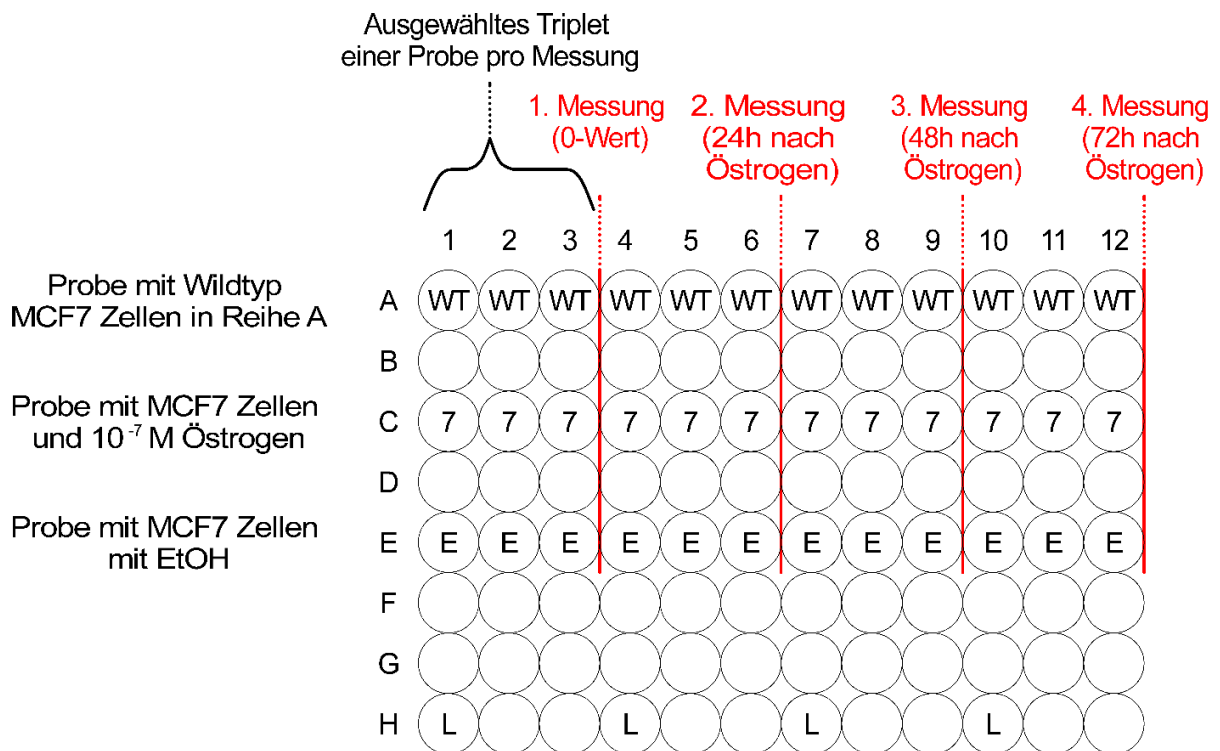


Abb. 8

### Abb. 8: 96-Well Platte mit unterschiedlichen Proben von MCF-7 Zellen

Die jeweilige Probe von MCF-7 Zellen ist in allen zwölf Wells einer Reihe aufgetragen. Die Messzeitpunkte sind hier durch eine vertikale rote Linie markiert. Pro Messzeitpunkt wurden jeweils drei Wells einer Probe gemessen (Triplet). Bei jeder Messung wurde zudem ein Leerwert (L) eruiert, welcher später in die Berechnungen miteinbezogen wurde.

Das Aussäen der Zellen erfolgte in Phenolrot freiem Nährmedium (DMEM) mit 10% FCS. Pro Well wurden 5000 Zellen ausgesät. In freie Wells ohne Zellen wurde PBS pipettiert. Nach der Aussaat wurde den Zellen 24 h Zeit gegeben, um adhärent zu werden. Anschließend wurde das WST-1 Reagenz im Verhältnis 1:1000 mit Phenolrot freiem Nährmedium ohne FCS verdünnt. Das zuvor in den Wells enthaltende Nährmedium wurde mittels Pasteurpipette abgesaugt und durch das verdünnte WST-1 Reagenz ersetzt. Zusätzlich wurde ein Well ohne Zellen mit verdünntem WST-1 Reagenz befüllt,



um hiermit den Leerwert zu bestimmen. Danach erfolgte die Inkubierung der Zellen für 60 Minuten bei 37°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Messung der Proben durch den ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die nun jeweils ermittelten Werte wurden als 0-Werte festgelegt, auf welche die anderen Messergebnisse am Ende des Versuchs normiert wurden. Am gleichen Tag wurde das Nährmedium aus den einzelnen Wells entfernt und durch Phenolrot freies Medium mit 5% FCS und Östrogen in den Konzentrationen  $10^{-7}$  M,  $10^{-10}$  M und  $10^{-12}$  M ersetzt. Eine Probe erhielt lediglich oben genanntes Nährmedium, 5% FCS und Ethanol als Kontrolle. Dies hatte den Zweck mögliche Effekte von Ethanol, in welchem das für den Versuch verwendete Östrogen gelöst war, auszuschließen. Im Folgenden wurden Messungen nach 24 h, 48 h und 72 h nach Östrogengabe durchgeführt.

Anschließend erfolgte die Berechnung der einzelnen Werte pro Probe MCF-7 Zellen. Dafür wurde zunächst der Leerwert der 0-Wert Messung von den einzelnen Probenwerten eines Triplets der 0-Wert Messung subtrahiert. Danach wurden die einzelnen Werte des jeweiligen Triplets addiert und aus dieser Summe der Mittelwert gebildet. Dieser Wert wurde schlussendlich auf 1 normiert. Für die weiteren Messpunkte wurde bis zur Berechnung der Mittelwerte analog vorgegangen. Zusätzlich wurde bei den weiteren Messungen der Mittelwert durch den jeweiligen zuvor berechneten Mittelwert der 0-Wert Messung dividiert. Der daraus resultierende Wert entsprach der Wachstumsrate zu gegebenem Zeitpunkt.

#### **3.2.4. Transiente Transfektion von MCF-7 Zellen für einen ER $\alpha$ Knockdown**

Um einen Knockdown des Östrogenrezeptors  $\alpha$  in MCF-7 zu erzielen wurde eine transiente Transfektion mittels siRNA gegen das Zielgen durchgeführt. Dafür fand zunächst die Aussaat von MCF-7 Zellen in eine 6-Well Platte mit Phenolrot freiem Medium und 10% FCS statt. Je nach Versuch wurden dafür unterschiedliche Mengen an Zellen pro Well ausgesät. Für Mikroskopie-Versuche wurden 200.000 Zellen/Well, für Soft-Agar-Assay-Versuche 20.000 Zellen/Well ausgesät. Darauf folgend fand eine Inkubation der Zellen für 24 h statt, um eine Adhärenz der Zellen zu erreichen. Die verwendete siRNA mit Ausgangskonzentration von 20  $\mu$ M wurde durch Verdünnung mit RNase freiem Wasser und OptiMEM auf eine Konzentration von 100 nM eingestellt. Als Transfektionsreagenz wurde RNAiMAX verwendet. Es erfolgte zudem eine analoge Vorgehensweise mit einer scrambled Kontroll-siRNA, welche lediglich zu unspezifischen Knockdowns führt. Nachdem alle Reagenzien mittels Vortexer in Eppendorfgefäßen

vermengt wurden, erfolgte anschließend noch eine kurze Zentrifugation. Danach wurden die Reagenzien auf die am Vortag ausgesäten Zellen in den entsprechenden Wells der 6-Well Platte pipettiert. Es schloss sich daraufhin eine erneute Inkubation der Zellen für 48 h an. Eine Überprüfung der Knockdown-Qualität des ER $\alpha$  fand durch eine Western Blot Analyse im Zeitraum von 48 bis 72 h nach Transfektion statt.

Ziel-mRNA	Sequenz ( 5' → 3' )
Hs_ESSRRA_1	CCGAGAGATTGTGGTCACCAT
Kontroll-siRNA	GATCCGTAGGCATACCGTATG

Tab. 5

**Tab. 5: Sequenzen der siRNAs für Knockdown Experimente mit dem Östrogenrezeptor  $\alpha$**

### 3.3. Generierung stabiler Zelllinien

#### 3.3.1. Calcium-Phosphat-Präzipitation in HEK239T Zellen zur Generierung lentiviraler Überstände

Bei der Calcium-Phosphat-Präzipitation wird Calciumchlorid mit der zu übertragenden DNA vermischt und anschließend ein phosphathaltiger Puffer hinzugegeben (Terpe, 2005). Hierdurch fällt Calciumphosphat aus, an das die DNA bindet (Präzipitatbildung) (Terpe, 2005). Anschließend wird dieses auf die HEK239T Zellen verbracht, die es durch Endozytose aufnehmen (Terpe, 2005). Für die Transfektion der HEK239T Zellen in dieser Arbeit wurden 4  $\mu$ l des pInducer20 Plasmids (s. Abb. 9) (sowohl mit als auch ohne R62D) und 8  $\mu$ l lentivirale Kapselvektoren (SPAX und MDG2) mit bidestilliertem Wasser gemischt und über zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde dieser Ansatz mit Calciumchlorid und dem phosphathaltigen Puffer gemischt und wiederum für 30 Minuten inkubiert. Nach Übertragung dieses Ansatzes auf die HEK239T Zellen (80% konfluent) erfolgte eine Inkubation für drei Stunden mit nachfolgendem Mediumwechsel. Anschließend wurden die Zellen in das S2 Labor verbracht, wo über zwei Stunden die Virusproduktion erfolgte. Im Anschluss wurde der lentivirale Überstand auf die Zielzellen pipettiert und für 24 h inkubiert. Danach folgte noch ein letzter Mediumwechsel, bevor die Zielzellen für weitere Experimente verwendet wurden.

### 3.3.2. **Lentivirale Transduktion von MCF-7 Zellen zur Erlangung von R62D-Mutanten**

Zur Herstellung von MCF-7 Zellen mit einer polymerisierungsunfähigen nukleären dysfunktionalen Aktinvariante (R62D-Aktin), wurde eine stabile Transfektion mittels lentiviralem Vektor durchgeführt. Dies bedeutet, dass Zelllinien generiert wurden, welche ein bestimmtes Gen (in diesem Falle das Gen für R62D-Aktin) dauerhaft exprimieren können. Für die Transduktion der in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurde das lentivirale Vektorsystem pInducer20 verwendet. Die Herstellung von viralen Plasmiden erfolgte in HEK239T Zellen. Die Inkubation der MCF-7 Zellen mit dem lentiviralen Plasmiden erfolgte mit 25 mg/ml Polybrene und 1 ml Virus-Überstand für drei Tage. Der Nachweis über die Funktionalität der R62D Expression wurde fluoreszenzmikroskopisch erbracht (s. Abb. 22).

Lentiviren sind in der Lage, das eigene Genom in das Genom eines Wirts, in diesem Fall das der Tumorzellen, zu integrieren (Rassow, Hauser, Netzker, & Deutzmann, 2012, S. 519). Daher werden Lentiviren im Bereich der Gentechnik häufig als Vektoren (=Transporter) verwendet, um die Möglichkeit einer dauerhaften Expression eines bestimmten Zielgens zu erreichen (Karp, 2005, S. 958). Die Integration des viralen Genoms erfolgt zunächst über die Infektion der Zielzellen mit dem verwendeten Virus. Die Virus-RNA wird durch die virale reverse Transkriptase kopiert und es entsteht dabei eine doppelsträngige DNA-Kopie (sog. Provirus DNA), welche wiederum mittels viraler Integrase in das Wirtsgenom eingebracht wird (Rassow, Hauser, Netzker, & Deutzmann, 2012). Erfolgt anschließend die zelluläre Transkription, werden auch die ursprünglich viralen Gene transkribiert (Rassow, Hauser, Netzker, & Deutzmann, 2012, S. 519). Wichtig zu erwähnen ist außerdem, dass Retro-, beziehungsweise Lentiviren, welche für gentechnische Arbeiten verwendet werden, nicht replikationskompetent sind (Hildinger, 1999). Dies beschreibt, dass die verwendeten Viren zwar Zielzellen infizieren und ihr Genom integrieren können, sich jedoch nicht innerhalb des Wirts vermehren (Hildinger, 1999), was unter dem Aspekt der Sicherheit beim gentechnischen Arbeit relevant ist (Hildinger, 1999).

Das pInducer20-Vektorsystem weist die Besonderheit der Tetracyclin-induzierbaren cDNA-Expression auf, was bedeutet, dass durch Zugabe eines Tetracyclins, in diesem Falle Doxycyclin, die Expression des gewünschten Gens gezielt reguliert werden kann. (s. Kapitel 4.3. „Proliferation und Generierung nukleärer Aktinfilamente bei dysregulierter Aktinmutante in MCF-7 Zellen“). Dies war bei den nachfolgenden Experimenten insofern relevant, als dass eine durchgängige Expression von R62D-Aktin zum Absterben der

Zellen führte und somit eine induzierbare Expression ausschließlich während der Versuchsdurchführung notwendig war.

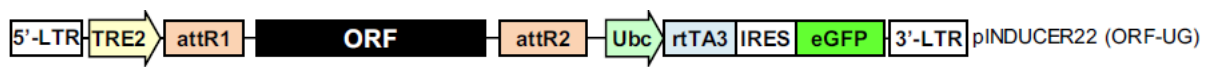


Abb. 9

---

### Abb. 9: Darstellung des pInducer20 Vektors

(Meerbrey et al., 2011) Komponenten des pInducer20 Vektorsystems: **TRE2** (Promotor), **attR1 & attR2** (Recombination-sites, flankieren das Gen), **ORF** (Open reading frame, beinhaltet Aminosäuren kodierende Basentriplets), **Ubc** (Promotor), **rtTA3** (Tetracycline repressor A3), **IRES** (internal ribosomal entry site), **eGFP** (enhanced GFP).

---

## 3.4. Mikroskopie

### 3.4.1. Fluoreszenzmikroskopie

Im Anschluss an die in 3.2.2. aufgeführte Stimulation und Fixierung der Zell-Präparate erfolgte die Mikroskopie der unterschiedlichen Proben mittels hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopen. Verwendet wurden hierfür die Mikroskope ZEISS LSM 700a, 700b und 800. Das Mikroskopieren der einzelnen Proben erfolgte verblindet. Dafür wurden zuvor die Beschriftungen der Objektträger mittels Klebebandes unkenntlich gemacht, neusortiert und mit Buchstaben beschriftet. Pro Präparat wurden 20 Zellen gezählt. Bedingung für die Auswahl einer Zelle war neben einer gut sichtbaren Zellkernebene das eindeutige Vorhanden- oder Nichtvorhandensein von Aktinfilamenten. Dies bedeutet, dass unspezifische, nicht-filamentöse Strukturen als Artefakte gewertet wurden und diese Zellen nicht in die Auswertung mitaufgenommen wurden. Nach Auszählung aller Präparate wurde die Beschriftung der Objektträger wieder erkenntlich gemacht und es erfolgte die Ermittlung der für nukleäres F-Aktin positiven Zellen in Prozent.

### 3.4.2. Live Cell Imaging

Das Live Cell Imaging der MCF-7 Zellen wurde mit den bereits für die Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Mikroskopen durchgeführt. Hierbei erfolgte die

Versuchsdurchführung mittels MCF-7 Zellen, welche durch einen nukleären Aktin-Chromobody (nAC) gekennzeichnet waren.

Bei dem Aktin-Chromobody handelt es sich um einen sogenannten Einzeldomänenantikörper (Melak, Plessner, & Grosse, 2017). Dies bedeutet, dass dieser im Gegensatz zu konventionellen Antikörpern, welche eine quartäre Struktur aufweisen, lediglich aus einer monomeren Domäne besteht (Melak, Plessner, & Grosse, 2017). Die Quelle dieser speziellen Antikörper stellen Alpakas (*Vicugna pacos*) dar (Melak, Plessner, & Grosse, 2017). Die Expression des verwendeten Chromobodys erfolgte mittels lentiviraler Transduktion.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde ein Konstrukt verwendet, welches einen Aktin-Chromobody, gekoppelt an GfP (Green fluorescent Protein) und eine NLS (Nuclear localization sequence) beinhaltet. Das GfP wurde ursprünglich aus Quallen (*Aequorea victoria*) generiert und zeigt eine grüne Fluoreszenz bei Anregung mit diversen Lichtspektren. Das NLS wurde verwendet, um das Konstrukt ausschließlich im Zellkern zu exprimieren.

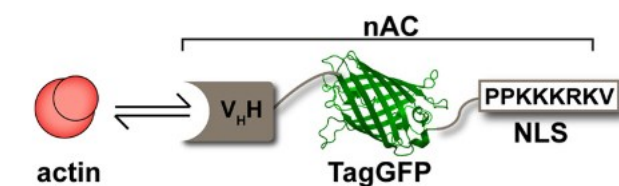


Abb. 10

---

**Abb. 10: Darstellung der Interaktion von Aktin mit dem Nuclear Actin Chromobody (nAC)**

Aktin (rot dargestellt) interagiert mit der V<sub>H</sub>H-Domäne (Teil der schweren Kette des Antikörpers), an welchen ein Green-fluorescent Protein-Tag (GfP) und eine NLS (Nuclear localization sequence) gekoppelt wurde (Plessner, Melak, Chinchilla, Baarlink, & Grosse, 2015).

---

Für Live Cell Imaging-Versuche wurden MCF-7 Zellen in Phenolrot freiem Medium zu je 20.000 bis 30.000 pro Well einer Ibidi-Kammer ausgesät. Das dabei verwendete Nährmedium beinhaltete 10% FCS.

Für Live Serum-Stimulationsversuche wurde das Nährmedium am Folgetag ersetzt und durch Phenolrot freies Medium ohne FCS ersetzt. Darüber hinaus wurde in den Wells

eine Östrogenkonzentration von  $10^{-7}$  M eingestellt. Am nächsten Tag wurde dann das Östrogen aus den Wells entfernt, sodass lediglich Nährmedium ohne FCS in den Wells vorhanden war. Die Stimulation mit FCS erfolgte am nächsten Versuchstag unter dem Mikroskop. Dafür wurden unter dem Mikroskop zunächst mehrere Zellkerne mit einem adäquaten GfP-Signal aufgesucht und entsprechend vergrößert. Im Anschluss wurden die Einstellungen für Videosequenzen am Mikroskop vorgenommen. Dabei wurden diese so gewählt, dass im Sekundentakt Aufnahmen der Zellen angefertigt wurden. Die Gesamtlänge der Videosequenzen betrug meist wenige Minuten. Diese Zeitrahmen wurden basierend auf der Beschreibung der zeitlichen Entstehung von nukleären Aktinfilamenten bei Serumstimulation nach Baarlink et al. gewählt. Während des Ablaufs der Videosequenz wurde unverdünntes FCS in das jeweilige Well der Ibidi-Kammer pipettiert, welches die ausgewählten Zellen beinhaltete. Dabei wurde die Menge an zu pipettierendem FCS so berechnet, dass zusammen mit dem bereits vorhandenem Nährmedium eine Gesamtkonzentration von 20% FCS erreicht wurde.

Für Live-Aufnahme von MCF-7 Zellen während der Mitose, wurde analog vorgegangen, mit der Ausnahme, dass kein Mediumwechsel erfolgte. Die Videosequenzen wurden am Folgetag erstellt. Hierbei wurden im Abstand weniger Minuten Bilder der sich teilenden Zellen generiert, die Gesamtlaufzeit beträgt mehrere Stunden.

### 3.4.3. **Soft-Agar-Assays**

Um die Proliferationseigenschaften, sowie deren Beeinflussung unter nicht-adhärenenten Bedingungen zu messen, wurden Soft-Agar-Assays durchgeführt. Dieser Variante von Wachstumsassay liegt die Herstellung eines Agar-Gemisches zugrunde, in dem die verwendeten Zellen auf ihr Wachstumsverhalten und insbesondere auf ihre Fähigkeit hin Kolonien zu bilden, untersucht werden (Borowicz et al., 2014). Ein Beispiel für die Verwendung der Soft-Agar-Assays ist unter anderem der Bereich der Mammakarzinom Forschung im Rahmen von Testungen neuer medikamentöser Therapien (Horibata et al., 2015). Für die Durchführung der in dieser Arbeit erläuterten Experimente wurde zunächst ein Agar-Gemisch aus 2,4% Agar und destilliertem H<sub>2</sub>O hergestellt und im Anschluss autoklaviert. Danach erfolgte das Aufkochen des Agars mit nachfolgendem Abkühlen auf eine Temperatur von ca. 37°C. Unter sterilen Bedingungen erfolgte die Bereitstellung eines Wasserbades mit einer Temperatur von 42°C, einem zuvor autoklavierten Glasgefäß sowie Phenolrot freiem Medium mit einem 10%-igem FCS Gehalt und 10x MEM (Minimal Essential Medium). Für die MCF-7 Varianten, bei denen eine Expression von R62D oder GfP herbeigeführt werden sollte, wurde das Medium mit

Doxycyclin (1 mg/ml) versetzt. Die Reagenzien samt Glasgefäß wurden im Wasserbad langsam erwärmt. Im Anschluss wurden 12,5 ml Agar mit 1,25 ml MEM und 37,5 ml Phenolrot freiem Medium mit 10% FCS vermischt. Außerdem wurde für bestimmte Varianten der MCF-7 Zellen eine Östrogenkonzentration von  $10^{-7}$  M für das Agar-Gemisch eingestellt. Die Endkonzentration des Boden-Agars betrug hierbei 0,6%. Anschließend wurde das Gemisch im Wasserbad auf 42°C erwärmt. In die Wells einer 6-Well Platte wurde jeweils 1 ml des Agar-Gemischs pipettiert. Nach Aushärtung des Agars wurden die unterschiedlichen Varianten der MCF-7 Zellen in Suspension gebracht und zu 20.000/Well in eine 12-Well Platte verbracht, welche pro Well mit 1 ml Phenolrot freiem Medium aufgefüllt wurde. In selbige Wells wurde danach 1,5 ml des Agar-Gemisches pipettiert, sodass eine Endkonzentration von 0,36% entstand. Nach Vermengung des Agargemisches mit den Zellen wurden diese auf die 6-Well Platte aufgebracht. Hierbei wurden drei Wells pro MCF-7 Variante verwendet. Eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> schloss sich hieran an. Nach zwei Wochen wurden mit einem speziellen Zähl-Okular zehn Gesichtsfelder pro Well gezählt und aus den Triplikaten einer MCF-7 Variante ein Mittelwert gebildet. Die Zählung erfolgte bei 100-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop durch zwei unterschiedliche verblindete Personen.

#### **3.4.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot**

Zunächst wurden für die jeweiligen Versuche Zellen in die Wells von 6-Well Platten zu je 200.000 bis 300.000 Zellen/Well ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bis diese adhärent geworden waren. Am Folgetag erfolgte eine jeweilige Vorbehandlung der Zellen, beispielsweise mit siRNA und/oder Östrogen. Nach Entsprechender Vorbehandlung erfolgte die Trennung der Proteine mittels Laemmli-Puffer (2-fach Konzentriert) innerhalb der Wells. Anschließend erfolgte eine weitere Denaturierung der Proteine mittels Aufkochens bei 95°C für fünf Minuten.

Das Auftrennen der Proteine anhand ihres Molekulargewichts erfolgte in Polyacrylamid-Gelen. Je nach Größe des Zielproteins musste ein unterschiedlicher Acrylamid-Gehalt bei der Herstellung der Gele gewählt werden. Für die Detektion von (p-) Cofilin wurden dabei Gele mit 10% Polyacrylamid-Anteil verwendet, für die Detektion des ER $\alpha$ , Gele mit 8% Acrylamidanteil.

Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nach Polymerisation des Trenngels erfolgte die Herstellung eines Sammelgels, welches auf das Trenngel verbracht wurde. Im Anschluss erfolgte das Auftragen der unterschiedlichen Proben,



sowie des PageRulers (Ladekontrolle) in das Sammelgel. Die Glasplatten mit den enthaltenden Gelen wurden im Folgenden in eine Laufkammer verbracht, welche mit Laufpuffer befüllt wurde. Als Nächstes wurde ein elektrisches Feld zur Auftrennung der Proben erzeugt. Zu Beginn der Auftrennung wurde eine Spannung von 80 Volt eingestellt. Zu Beginn der Auftrennung im Trenngel wurde diese auf 120 Volt erhöht. Im Anschluss hieran erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Dafür wurde die Membran zusammen mit dem Trenngel und den dort enthaltenen Proteinen wiederum in ein Kammersystem verbracht, welches mit Transferpuffer befüllt wurde. Die Durchführung des Transfers erfolgte bei einer Stromstärke im Kammersystem von 350 mA für 60 Minuten und bei einer Temperatur von 4°C. Danach wurde die Qualität des Proteintransfers mittels Ponceau-Rot Färbung der Nitrozellulosemembran kontrolliert, dem sich eine Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit Milchpulverlösung (5% Milchpulver in TBST) für 45 bis 60 Minuten anschloss. Für die Proteindetektion wurde ein Primärantikörper gegen ER $\alpha$  (Ursprung: Hase) oder (p-) Cofilin (Ursprung: Hase) mit einer Verdünnung von 1:1000 in Blockierungspuffer bei 4°C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde die Nitrozellulosemembran dreimal für wenige Minuten mit TBST gereinigt. Anschließend wurde die Inkubation mit HRP-konjugiertem (Horseradish Peroxidase) Sekundärantikörper (Ursprung: Maus) (für ER $\alpha$  1:6000 in Milchlösung, für (p-)Cofilin 1:5000 in BSA) für eine Stunde vorgenommen. Nach erneutem dreimaligem Reinigen der Membranen wurde ECL-Substrat (Enhanced Chemiluminescence) aufgetragen, um die Visualisierung der Proteine auf Röntgenfilmen zu erzielen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Untersuchungen zur Ausbildung von nukleären Aktinfilamenten in diversen Tumorzelllinien

Zu Beginn der experimentellen Arbeiten dieser Dissertation war die Existenz eines nukleären Aktinnetzwerks lediglich in NIH3T3 Mauszellen beschrieben worden. Ob diese Struktur auch in humanen Zellen, insbesondere humanen Tumorzellen zu finden ist, war die erste Fragestellung dieser Arbeit. Weiterhin war eine initiale Fragestellung ob das Vorhandensein eines nukleären Aktinnetzwerks in Tumorzellen beeinflusst oder sogar abhängig von spezifischen Mutationen ist. Für eine Darstellung der wichtigsten vorhandenen Mutationen in den für diese Arbeit verwendeten Tumorzellen wurde die



Datenbank COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) des Sanger Instituts verwendet (Sanger Institute, 2018). Dabei wurden vor allem Mutationen bekannter Tumorsuppressor- sowie Onkogene bei der Auswahl berücksichtigt. Die Auswahl der verwendeten Zelllinien erfolgte neben Mutationsspektrum außerdem anhand des Ursprungsgewebes der Zelllinien, wobei häufige Tumorerkrankungen bevorzugt ausgewählt wurden. Eine Auswahl der benutzten Zelllinien ist in Tab. 6 dargestellt. Ein Zusammenhang zwischen Mutationen und nukleärem F-Aktin konnte im Weiteren nicht eindeutig festgestellt werden.

Erkrankungen	Mutation	Zelllinie
Mamma-Karzinom (Adeno) alternativ:	<b>TP53</b> ;HRAS - FLT3 ; PDGFRA	HS-578-T MCF10a MCF7 (Metastase Pleu)
Malignes Melanom  alternativ:	<b>BRAF</b> ; CSF1R; NTRK1,PDGFRB - TP53; [...]	LOX(Metastase LK) MV3 MeWo (Metastase LK)
Lungen-Karzinom (Adeno) alternativ:	<b>KRAS</b> ; FH; CBL TP53;BRCA1;CBLB; CDKN2A;DNMT3A; UBR5	A549 Calu-3 (Metastase Pleu)
Colon-Karzinom (Adeno)  alternativ:	<b>CTNNB1</b> ; BRAF; KRAS BRAF; TP53 KRAS [...]	LS180 HT-29 Lovo (Metastase Supracl)

Tab. 6

---

**Tab. 6: Auflistung diverser maligner Tumoren, mit dazugehörigen Mutationen und Zelllinien**

Es wurden pro Tumorerkrankung verschiedene Gene ausgewählt, welche nachweislich bei genannter Erkrankung mutiert sein können. Passend dazu wurden diverse Zelllinien ausgewählt, welche Mutationen in selbigen Genen tragen (Sanger Institute, 2018) (ATCC, 2018).

---

Für die Stimulationsversuche mit Serum wurden die Zellen zunächst in 0,5% FCS haltigem Nährmedium für 24 h starviert, bevor sie anschließend mit 20% FCS Nährmedium für 20 Sekunden stimuliert wurden. Darauffolgend wurden die Zellen mittels Glutaraldehyd- sowie Triton-haltigen Lösungen fixiert. Die Färbung der Zellen

erfolgte mit Alexa 488 Phalloidin zur Darstellung von Aktin, sowie mit DAPI zur Darstellung der einzelnen Zellkerne. Die Visualisierung der einzelnen Proben erfolgte nach weiteren 24 h unter dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop Zeiss LSM 700a. Dabei konnte bei der Mehrheit der verwendeten Zelllinien unter oben genannten Versuchsbedingungen keine Bildung eines nukleären Aktinnetzwerks beobachtet werden (s. Abb. 11c, Abb. 11d). Aufgrund technischer Probleme bei der Visualisierung der Filamente (s. Diskussionsteil) lässt sich aber nicht ausschließen, dass bei Verwendung sensitiverer Färbemethoden und Mikroskope nukleäre Aktinfilamente in diesen Zelllinien nachweisen lassen.

Ein positives Ergebnis stellte sich bezüglich der MCF-7 Zelllinie dar, bei der nukleäre Aktinfilamente gesehen werden konnten (Abb. 11a). Auch die Melanomzelllinie SbCl2 wies nukleäre Aktinfilamente bei Serumstimulationsversuchen auf (Abb. 11b). Weiterführende Experimente mit SbCl2 Zellen konnten aufgrund von Schwierigkeiten bei der Kultivierung (s. Kapitel 5.7.3. „SbCl2 Melanomzellen“) nicht durchgeführt werden, weswegen der Fokus in dieser Arbeit ausschließlich auf MCF-7 Zellen gelegt wurde. Die Entstehung eines nukleären Aktinnetzwerks in MCF-7 Zellen konnte außerdem in Live Experimenten bestätigt werden.

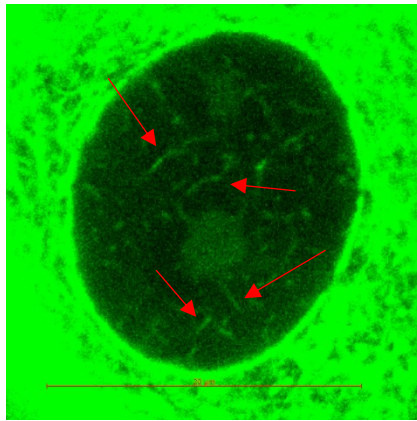


Abb. 11a

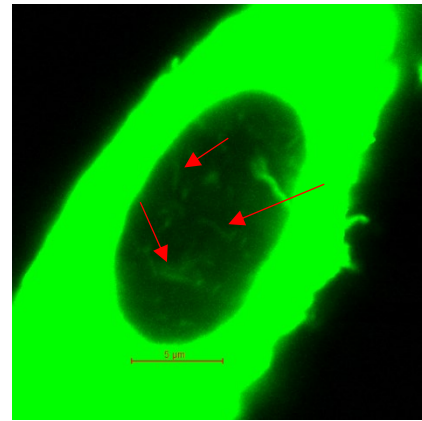


Abb. 11b

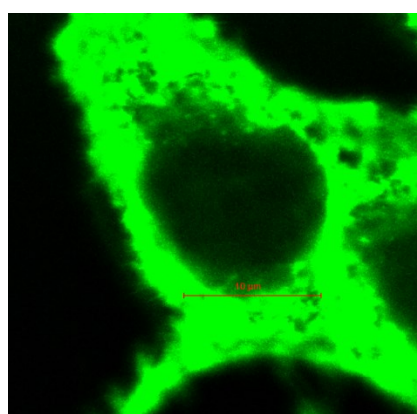


Abb. 11c

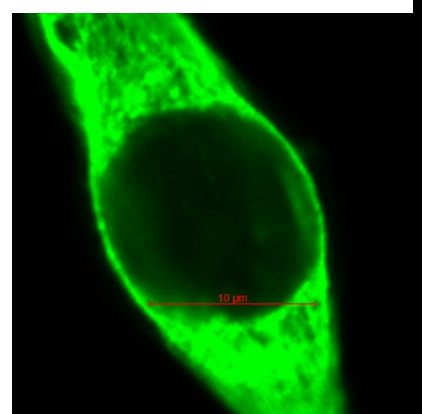


Abb. 11d

### **Abb. 11: Nachweis nukleärer Aktinfilamente in fixierten Tumorzelllinien**

Die Zellen wurden in 0,5% FCS haltigem Nährmedium für 24 h starviert, bevor sie anschließend mit 20% FCS Nährmedium für 20 Sekunden stimuliert und anschließend mittels Glutaraldehyd- sowie Triton-haltigen Lösungen fixiert wurden. Die Färbung der Zellen erfolgte mit Alexa 488 Phalloidin zur Darstellung von Aktin, sowie mit DAPI zur Darstellung der einzelnen Zellkerne. Um ein übersteigertes Signal des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden, wurden die Proben zudem mit Natriumborohydrat behandelt. Die Visualisierung der einzelnen Proben erfolgte nach weiteren 24 h unter dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop Zeiss LSM 700a.

**Abb. 11a: Nahaufnahme der Kernebene einer exemplarischen MCF-7 Zelle mit nukleären Aktinfilamenten (s. Pfeile)**

**Abb. 11b: Kernebene einer SbCl<sub>2</sub> Zelle, ebenfalls mit nukleären Aktinfilamenten**

**Abb. 11c: Kernebene einer A549 Zelle, ohne erkennbare nukleäre Aktinfilamente**

**Abb. 11d: Kernebene einer MeWo Zelle ohne nukleäre Aktinfilamente**

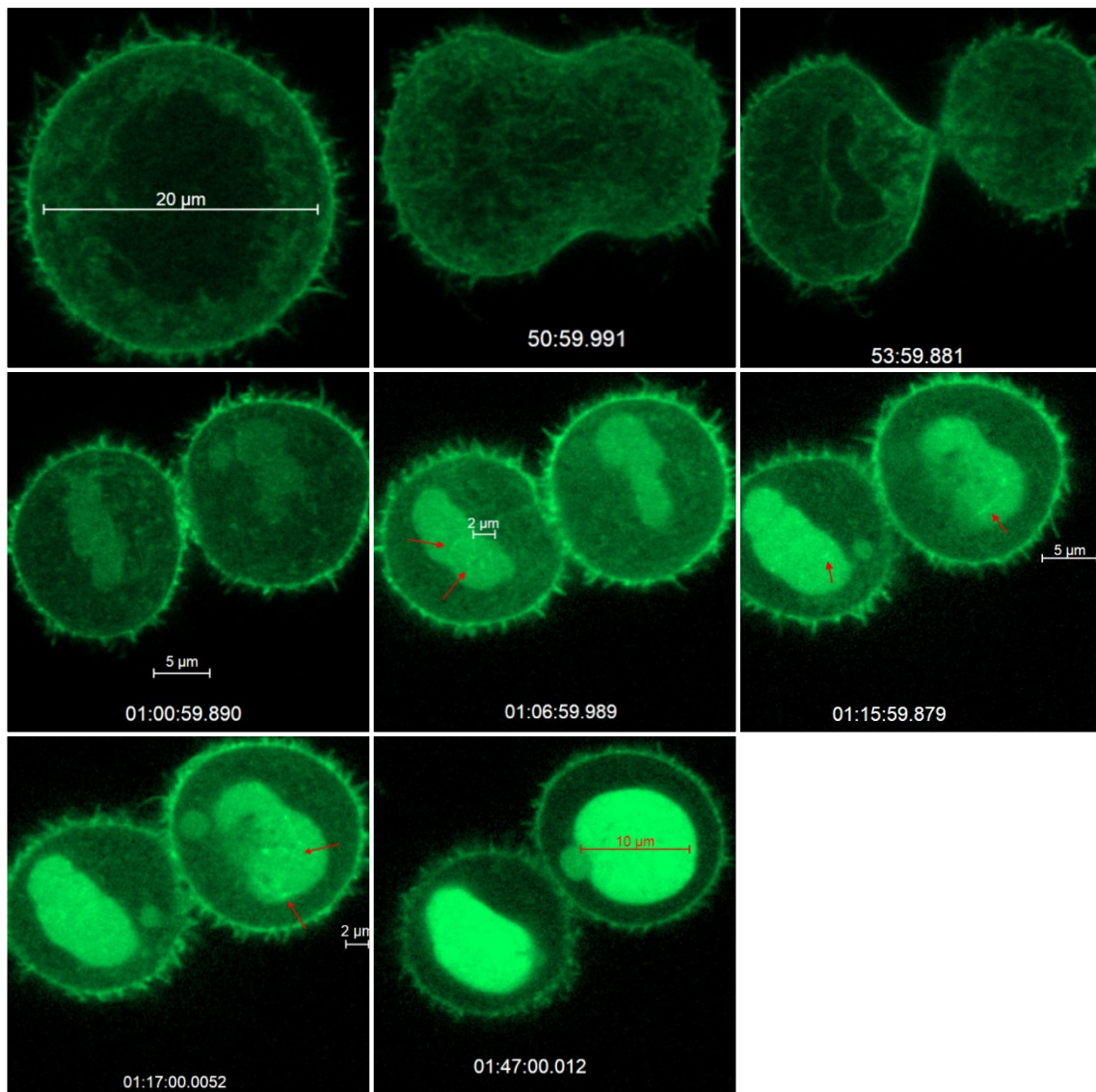


Abb. 12

### **Abb. 12: Ausbildung nukleärer Aktinfilamenten während der Mitose in lebenden MCF-7 Zellen**

Für Live Cell Imaging-Versuche wurden MCF-7 Zellen in Phenolrot freiem Medium zu je 20.000 bis 30.000/Well einer Ibidi-Kammer ausgesät. Das dabei verwendete Nährmedium war frei von Phenolrot und beinhaltete 10% FCS. Anschließend wurde eine sich in Mitose befindliche Zelle ausgewählt und die Kamera des Mikroskops auf dieser fixiert (Erste Bildsequenz = Zeitpunkt 0). Im Abstand weniger Minuten wurden Bilder dieser mitotischen Zelle angefertigt (Zeitangaben in hh:mm:ss im unteren Bildabschnitt der einzelnen Sequenzen). Insgesamt erfolgten die Videosequenzen zum Aufzeichnen der Mitose über meist mehrere Stunden. Während der Mitose konnte die Entstehung nukleären F-Aktins beobachtet werden (s. Pfeile). Die Aufnahmen wurden nach abgeschlossener Mitose der Zelle beendet. Die Abbildung des Aktinnetzwerks lässt sich digital eindeutiger darstellen.

## 4.2. Der Einfluss von Östrogen auf die Ausbildung nukleärer Aktinfilamente in MCF-7 Brustkrebszellen

Das Steroidhormon Östrogen ist in Tumorzellen mit Hormonrezeptor als potenter Transkriptionsfaktor und Proliferationsstimulator bekannt. MCF-7 Zellen sind aufgrund ihres Rezeptorstatus und ihres Ansprechens auf Östrogenstimulation eine äußerst häufig verwendete Zelllinie für Proliferationsexperimente unter Östrogeneinfluss (Comşa et al., 2015). Nach dem Nachweis nukleärer Aktinfilamente in diesen Zellen stellte sich die Frage, ob die durch Östrogenstimulation gesteigerte Proliferation mit einer Veränderung der Ausprägung von nukleären Aktinfilamenten einhergeht.

In Kontrollversuchen wurde zunächst untersucht, ob sich die Proliferationsrate der hier verwendeten MCF-7 Zellen konzentrationsabhängig durch Östrogen stimulieren lässt. Erwartungsgemäß konnten an definierten Messzeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h nach Östrogengabe) Proliferationseffekte beobachtet werden (s. Abb. 13). Insgesamt ergab sich in den durchgeführten Proliferationsexperimenten eine typische Dosis-Wirkungskurve nach Östrogen Stimulation, was die Brauchbarkeit dieser Zellen für die weiteren Untersuchungen belegte.

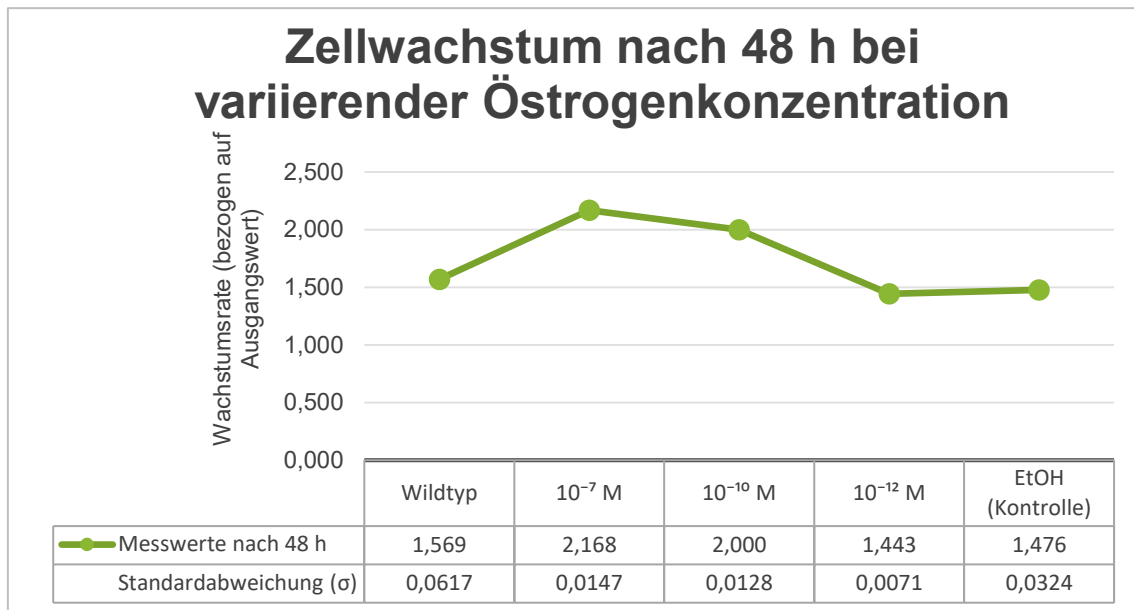


Abb. 13

#### **Abb. 13: Proliferation von MCF-7 Zellen auf Plastikoberflächen nach Östrogenstimulation**

MCF-7 Zellen wurden auf 96-Well Platten ausgesät (5000 Zellen/Well) und nach Starvierung für 24 Stunden mit den angegebenen Östrogenkonzentrationen behandelt. Die Zellzahl wurde nach 48 Stunden im Vergleich zum Ausgangswert mittels WST Assay bestimmt. Die Experimente wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte der Proliferationsraten nach 48 Stunden (n= 1).

In einem weiteren Kontrollexperiment wurde untersucht, ob das Potenzial der MCF-7 Zellen östrogenabhängig Kolonien im Softagar Assay zu bilden abhängig von der Expression des Östrogenrezeptors ERα ist. Zunächst wurde die Spezifität und Effektivität des siRNA vermittelten Knock-Downs des ERα in transienten Transfektionsexperimenten mittels Western Blot gezeigt (Abb. 14). Im Vergleich zur unspezifischen Kontroll-siRNA führte die Behandlung mit der gegen ERα gerichteten siRNA zu einer Reduktion der Proteinexpression um mehr als 75%.

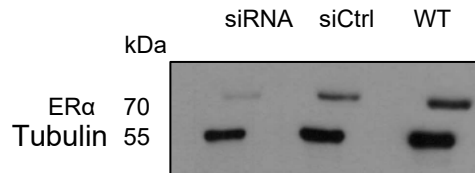


Abb. 14

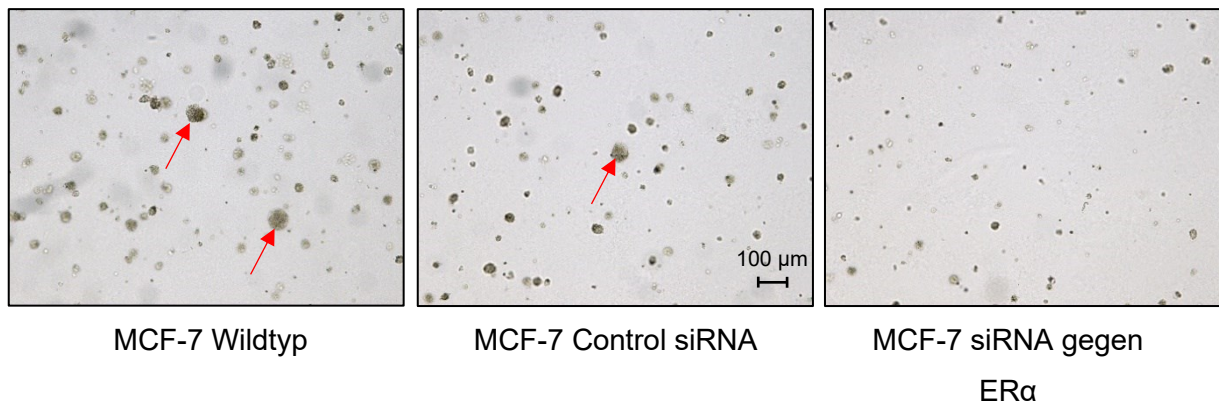
#### **Abb. 14: Spezifischer siRNA vermittelter Knockdown des Östrogenrezeptors ERα in MCF-7 Zellen**

MCF-7 Zellen wurden in 6-Well Platten ausgesät ( $10^5$  Zellen/Well) und nach 24 Stunden transient mittels Lipofectamine und 100 nmol der kommerziell erhältlichen spezifischen siRNA gegen ERα (siRNA-ERα) oder mit 100 nmol einer unspezifischen Kontroll-siRNA (siCtrl) transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und der spezifische Nachweis des ERα-Proteins bei 70 kDa erfolgte mittels Western Blot. Als Ladekontrolle wurde die Proteinexpression von Tubulin (55 kDa) verwendet. Als weitere Kontrolle wurden nicht transfizierte MCF-7 Wildtypzellen verwendet (WT).

In den anschließend durchgeführten Soft-Agar Experimenten zeigte sich zunächst, wie erwartet, dass die Östrogenbehandlung ( $10^{-7}$  M) auch das nicht-adhärente Wachstum der MCF-7 Zellen signifikant steigern kann. Der siRNA-vermittelte Knockdown des Rezeptors führte im Vergleich zu den Kontrollzellen zu einem signifikant geringerem Koloniewachstum (Abb. 15, Abb. 16).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die hier verwendeten MCF-7 Zellen sowohl unter adhären als auch unter nicht adhären Wachstumsbedingungen die erwartete östrogenabhängige Stimulierbarkeit der Proliferation aufweisen. Dieser Effekt scheint größtenteils durch genomische Effekte des Östrogenrezeptors Era vermittelt zu werden.





**Abb. 15: Kolonienwachstum von MCF-7 Zellen im Softagar-Assay nach Östrogenstimulation**

Ausbildung von Kolonien im Soft-Agar nach siRNA-vermittelten Knockdown von ERα. Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte der Kolonien 14 Tage nach Einsäen von Einzelzellen. Die Pfeile markieren Kolonien > 60 µm, die später ausgezählt wurden (Skala, 100 µm).

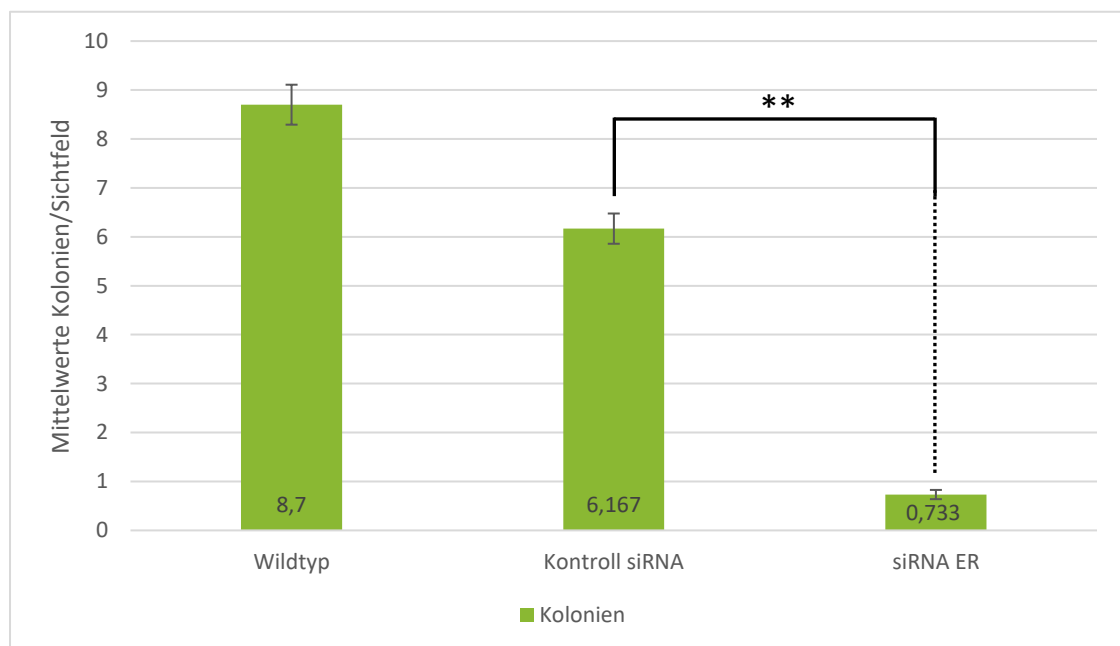


Abb. 16

**Abb. 16: Auswertung der Soft-Agar Experimente**

Die Quantifizierung erfolgte durch mikroskopisches Auszählen von Kolonien > 60µm (durch Pfeile in Abb. 15 markiert) durch 2 verblindete Untersucher. Die Normierung erfolgte auf die Kontrollzellen (n= 3; MW + SD; \*\* p < 0,01, Students t-Test).



#### **4.2.1. Der Einfluss von Östrogen auf die Quantität von MCF-7 Zellen mit nukleärem F-Aktin**

Nach der Visualisierung des nukleären filamentösen Aktinnetzwerks in MCF-7 Zellen (s. Abb. 11, Abb. 12) und dem funktionellen Nachweis ihrer östrogenabhängigen Proliferation (s. Abb. 13, Abb. 14, Abb. 15), wurde nun untersucht, ob die Behandlung mit Östrogen die Entstehung des nukleären Aktinnetzwerks beeinflusst. Die Tumorzellen wurden dafür in drei unabhängigen Experimenten mit vier unterschiedlichen Östrogenkonzentrationen über 24 h behandelt. Zuvor erfolgte der oben erwähnte Starvierungsvorgang mit anschließender Färbung und Fixierung der Tumorzellen. Für die Eruiierung des Kontrollwertes wurden MCF-7 Tumorzellen ohne Östrogenbehandlung verwendet, welche lediglich nach Starvierung mit 20% FCS Nährmedium stimuliert wurden. Nach Östrogengabe zeigte sich einerseits einer veränderte Morphologie des Zytoskeletts der Tumorzellen, im Sinne einer Verdichtung der Aktinstrukturen. Andererseits konnte ein signifikanter konzentrationsabhängiger Effekt des Östrogens bei der Anzahl der für nukleäres Aktin positiven Tumorzellen beobachtet werden. Bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  M Östrogen konnte der deutlichste Anstieg der Anzahl an positiven Tumorzellen erfasst werden (2,7-fach). Die hier beobachtete Dosis-Wirkungsbeziehung zeigte eine sehr große Übereinstimmung mit der östrogenabhängigen Stimulation der Proliferation (s. Abb. 13), was erstmalig die Hypothese lieferte, dass die Ausbildung des nukleären Aktinnetzwerks mit der Proliferationsrate von Tumorzellen zusammenhängt.

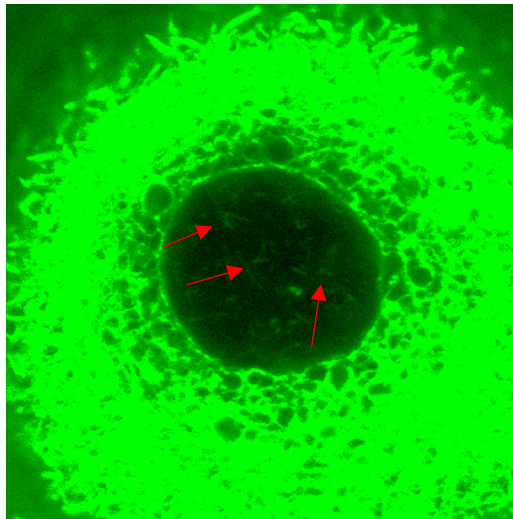


Abb. 17

---

**Abb. 17: Repräsentative MCF-7- Zelle mit nukleären Aktinfilamenten nach Östrogengabe**

Die Zellen wurden in 0,5% FCS haltigem Nährmedium für 24 h starviert, bevor sie anschließend mit 20% FCS Nährmedium für 20 Sekunden stimuliert und anschließend mittels Glutaraldehyd- sowie Triton-haltigen Lösungen fixiert wurden. Die Färbung der Zellen erfolgte mit Alexa 488 Phalloidin zur Darstellung von Aktin. Die Visualisierung der einzelnen Proben erfolgte nach weiteren 24 h unter dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop Zeiss LSM 700a.

---

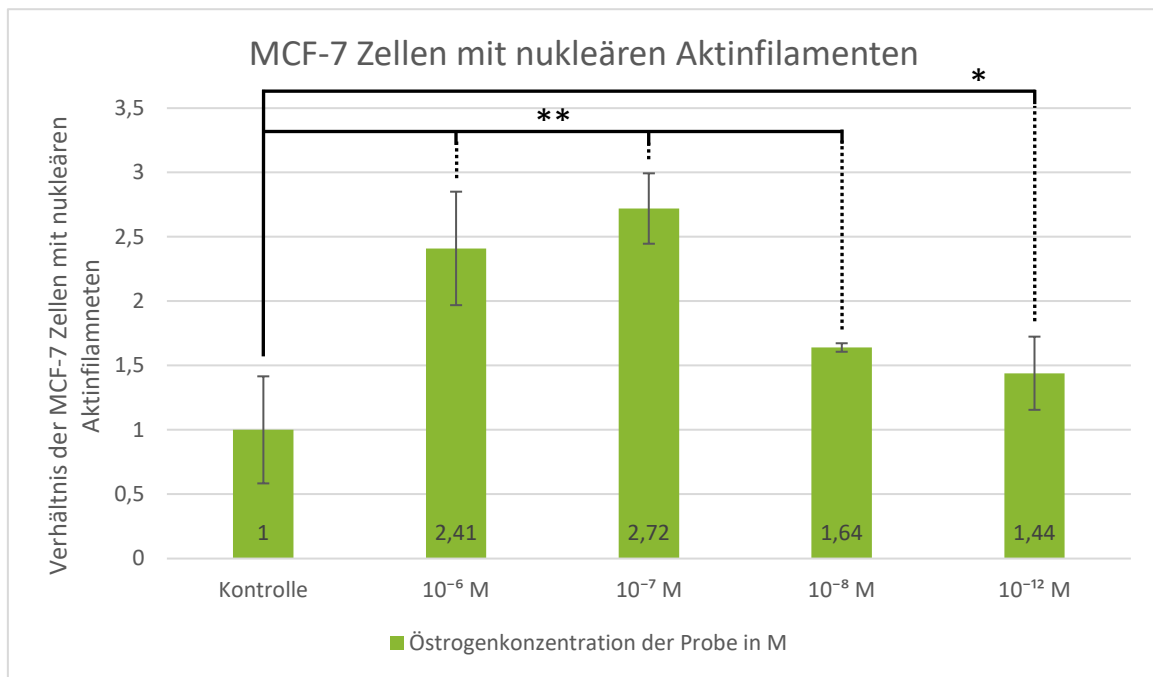


Abb. 18

#### **Abb. 18: Quantifizierung der Anzahl der MCF-7 Zellen mit nukleären Aktinfilamenten nach Vorbehandlung mit unterschiedlichen Östrogenkonzentrationen**

Die MCF-7 Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit vier unterschiedlichen Östrogenkonzentrationen über 24 h behandelt. Zuvor erfolgte der oben erwähnte Starvierungsvorgang mit anschließender Färbung und Fixierung der Tumorzellen. Die Normierung erfolgte auf die Kontrollzellen ohne Östrogenbehandlung. Die Auszählung erfolgte verblindet (n=3; MW + SD; \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, einfaktorielle ANNOVA).

#### **4.2.2. Die Wirkung von Östrogen auf die Phosphorylierung von Cofilin**

Cofilin ist ein in Zellen ubiquitär vorkommendes Aktin-Bindungsprotein, welches einen bedeutenden Stellenwert hinsichtlich der Umgestaltung von Aktinfilamenten inne hat (Pollard, 2016). Funktionell gesehen gehört Cofilin zur Familie der actin depolymerization factors (ADF), welche im aktiven, d.h., nicht phosphoryliertem Zustand die Dissoziation von Aktinpolymeren forcieren (Bamburg & Bernstein, 2010) (Yuen et al., 2011). Die Phosphorylierung – und somit Inaktivierung- von Cofilin erfolgt über die LIM Kinase (LIMK) (Yuen et al., 2011). Dies hat im Umkehrschluss zur Folge, dass es durch den oben genannten Mechanismus zur Stabilisation von Aktinnetzwerken kommt (Yuen et al., 2011). In einer Arbeit von Yuen et. al. (2011) konnte gezeigt werden, dass durch Östrogenstimulation von neuronalen Zellen eine Phosphorylierung und somit Aktivierung

der LIM Kinase erzielt werden kann. Dieser Effekt wird derzeit von diversen Arbeitsgruppen intensiv erforscht (Wang et al., 2019).

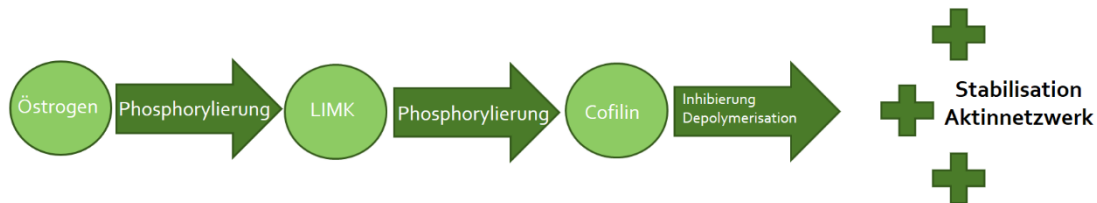


Abb. 19

---

**Abb. 19: Schematische Darstellung der Beeinflussung von Cofilin durch Östrogen**

Östrogen führt in neuronalen Zellen zur Phosphorylierung der LIM-Kinase (LIMK), was hierbei zu einer Aktivierung dieser führt. Durch LIMK wird Cofilin somit phosphoryliert und die depolymerisierenden Eigenschaften von Cofilin somit inhibiert, was zu einer Stabilisation des Aktinnetzwerks führen könnte (Yuen et al., 2011).

---

Der von Yuen et al. erwähnte Mechanismus wurde auch in dieser Arbeit als möglicher Signalweg bei der Entstehung, beziehungsweise Persistenz von nukleären Aktinnetzwerken in MCF-7 Zellen in Betracht gezogen. Zur Überprüfung der Wirkung von Östrogen auf Cofilin in MCF-7 Zellen wurden die Zellen gemäß der vorangegangenen Östrogenversuche in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass in Zellen, welche mit Östrogenkonzentrationen von  $10^{-6}$  M bis  $10^{-7}$  M stimuliert wurden, insgesamt signifikant weniger Cofilin exprimiert wurde. In Zellen, welche mit deutlich geringeren Östrogenkonzentrationen stimuliert wurden, konnten höhere Mengen an Cofilin detektiert werden. Der Vergleich mit nicht-stimulierten MCF-7 Zellen zeigt deutlich, dass Östrogen einen repressiven Effekt auf die Cofilin-Expression im Allgemeinen zu haben scheint, anstatt lediglich zu einer vermehrten Phosphorylierung desselben zu führen. Die reduzierte Cofilin-Expression korreliert deutlich mit der dosisabhängigen östrogenvermittelten Zunahme des Aktinnetzwerks (s. Abb. 18).

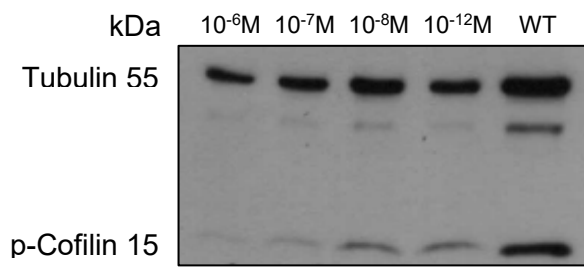


Abb. 20a

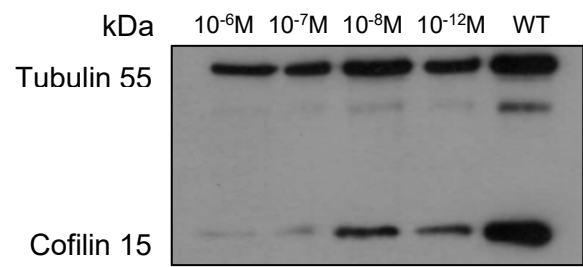


Abb. 20b

---

**Abb. 20: Proteinexpression von p-Cofilin (Abb. 20a) und Gesamt-Cofilin (Abb. 20b) in MCF-7 Zellen nach Östrogenbehandlung**

MCF-7 Zellen wurden in 6-Well Platten ausgesät (100.000 Zellen/Well) und mit den angegebenen Östrogenkonzentrationen inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und der spezifische Nachweis des Gesamt-Cofilinproteins und des Phospho-Cofilins bei 15 kDa erfolgte mittels Western Blot. Als Ladekontrolle wurde die Proteinexpression von Tubulin verwendet.

---

#### 4.2.3. Expression von Cofilin nach Östrogengabe auf RNA- Level mittels qPCR

Zur Überprüfung, ob sich eine Östrogenstimulation tatsächlich repressiv auf die Cofilin Expression auswirkt, wurde unter gleichen Bedingungen wie für die Western Blot-Experimente eine qPCR durchgeführt. In diesem Experiment konnte die Vermutung, dass eine Östrogenstimulation bereits auf RNA Niveau eine deutliche Reduktion der Cofilinexpression hervorruft, bestätigt werden. Hierbei wurde die Expression von Cofilin in unbehandelten Wildtypzellen mit 100% angegeben. Bei Östrogenkonzentrationen von  $10^{-12}$  M konnte eine Reduktion der Cofilinexpression von 38%, bei Östrogenkonzentrationen von  $10^{-6}$  M eine Reduktion von 88% gezeigt werden, was sehr gut mit den Ergebnissen auf der Proteinebene übereinstimmte.

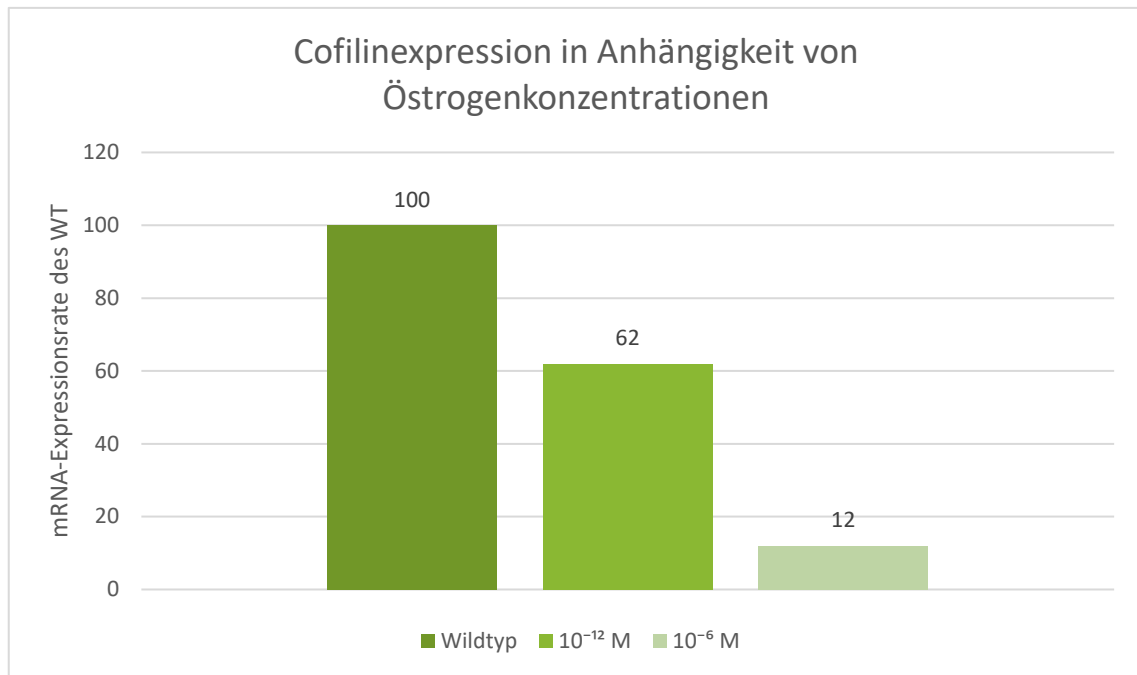


Abb. 21

**Abb. 21: Ermittlung der Gesamt-Cofilin-Expression auf RNA-Ebene mittels qPCR bei mit unterschiedlichen Östrogenkonzentrationen vorbehandelten MCF-7 Zellen**

Die Kontroll-Probe (Wildtyp) wurde nicht mit Östrogen behandelt. Die Expression von Cofilin wurde dort auf 100% gesetzt und die Werte der anderen Proben rechnerisch darauf bezogen. In diesem Experiment waren die Expressionen von p-Cofilin und Cofilin nicht trennbar, daher fließen hierbei die Expressionslevel beider Formen ein, ohne dass eine Unterscheidung in der Expression zwischen der phosphorylierten und der nicht phosphorylierten Form vorgenommen werden kann (n=1).

#### 4.3. Proliferation und Generierung nukleärer Aktinfilamente bei dysfunktionaler R62D Aktinmutante in MCF-7 Zellen

Wie in vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, bewirkt eine Östrogenstimulation von MCF-7 Zellen nicht nur eine vermehrte Proliferation, sondern auch eine Zunahme an nukleären Filamenten bildenden Tumorzellen. In Bezug auf die genannten Effekte war es daher in dieser Arbeit von Interesse, zu eruieren, ob die nukleäre Expression einer dysfunktionalen Variante des Aktins (R62D) diese Effekte verhindern kann. Der molekulare Unterschied zwischen R62D-Aktin und Wildtyp-Aktin besteht in einem Austausch von Arginin mit Asparaginsäure (Baarlink, Wang, & Grosse,

2013), was zur Folge hat das R62D-Aktin Monomere (G-Aktin) nicht wie Wildtyp-Aktin zu filamentösen Strukturen (F-Aktin) polymerisieren können, was wiederum zu signifikanten Veränderungen von aktinabhängigen zellulären Prozessen führt (Baarlink, Wang, & Grosse, 2013).

Das für diese Arbeit verwendete R62D-Aktin wurde zudem an eine NLS (= nuclear localization sequence) gekoppelt. Dabei handelt es sich um eine Signalsequenz, gebildet aus diversen Aminosäuren, welche an ein Zielmolekül angefügt wird und dazu führt, dass das jeweilige Zielmolekül über spezielle Rezeptorkomplexe in den Zellkern einer Zelle eingeschleust wird (Lange et al., 2007). Dies wurde verwendet, um etwaige Effekte durch R62D-Aktin auf den Zellkern der MCF-7 Zellen zu beschränken. Für die nachfolgenden Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden stabile R62D-Aktin-Zelllinien mittels viraler Transfektion hergestellt (s. Kapitel 3.3. „Generierung stabiler Zelllinien“). Adäquat R62D-Aktin exprimierende Zellen wurden unter Zuhilfenahme durchflusszytometrischer Verfahren identifiziert und zur Kultivierung verwendet. Währenddessen ergab sich die Problematik, dass Tumorzellen, welche permanent R62D-Aktin exprimierten, vermehrt apoptotisch wurden, sodass weder eine erfolgreiche Anzucht von derlei gentechnisch veränderten Tumorzellen noch die Durchführung von Experimenten mit genannten Zellen, möglich war. Aufgrund dessen ergab sich die Notwendigkeit einer kontrollierbaren Genexpression, für welche hierbei ein **Tetracyclin**-abhängiges System ausgewählt wurde.

Die gezielt regulierbare Genexpression mittels Tetracyclinen beruht auf Interaktionen dieser mit funktionellen Einheiten in bakteriellen Operonen, die für Resistenzmechanismen gegenüber selbiger Antibiotikagruppe verantwortlich sind (Das et al., 2016).

Generell sind hierbei sogenannte Tet-Off Systeme (Verhinderung von Genexpression nach Tetracyclingabe) und Tet-On Systeme (Getriggerte Genexpression nach Tetracyclingabe) zu unterscheiden (Das et al., 2016).

Für die gezielte Expressionsinduktion von R62D-Aktin in dieser Arbeit wurde ein Tet-On System verwendet, welches im Folgenden beschrieben wird.

Bei Tet-On Systemen wird eine in ihren Aminosäuren vom Original abweichende TetR-Variante verwendet, welche eine konträre Funktion im Vergleich zu, der im Beispiel aufgeführten TetR-Variante aufweist. Dies bedeutet, dass eine Tetracyclingabe in diesem System zur **Bindung** von TetR an tetO Elemente **mit** anschließender Promotor**aktivierung** und letztendlich forcierter Transkription des Zielgens führt (Das et al., 2016). Unter Verwendung dieses Systems gelang es stabil transduzierte MCF-7

Zellen mit Doxycyclin-induzierbarer nukleärer R62D-Aktinexpression zu generieren (s. Abb. 22).

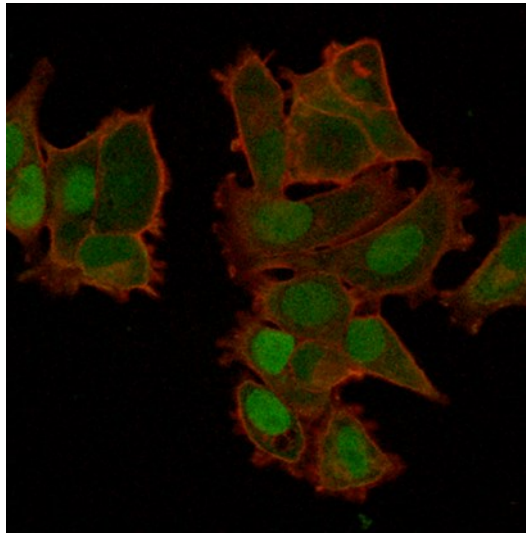


Abb. 22

---

**Abb. 22: MCF-7 Zellen nach stabiler Transfektion mit R62D Expression**

Das zytoplasmatische Wildtypaktin wurde mit Alexa 647 Phalloidin (rot) zur besseren Unterscheidung zum nukleären R62D-Aktin angefärbt. R62D-Aktin gekoppelt mit GfP (grün).

---

#### **4.3.1. Einfluss der dysregulierten R62D-Aktinmutante auf die Proliferation von MCF-7 Zellen**

Für den Vergleich des Proliferationsverhaltens zwischen MCF-7 welche R62D-Aktin exprimieren und MCF-7 Zellen mit Wildtyp-Aktin wurde sowohl ein WST- als auch ein Soft-Agar-Assay durchgeführt. Im WST-Assay war zu erkennen, dass R62D-Aktin exprimierende Zellen eine deutlich geringere Wachstumsrate gegenüber Wildtyp-Aktin exprimierenden MCF-7 Zellen aufweisen (s. Abb. 23). Bereits nach 72 h zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Proben. Nach langanhaltender R62D Expression kam es hierbei zum Absterben der Zellen.



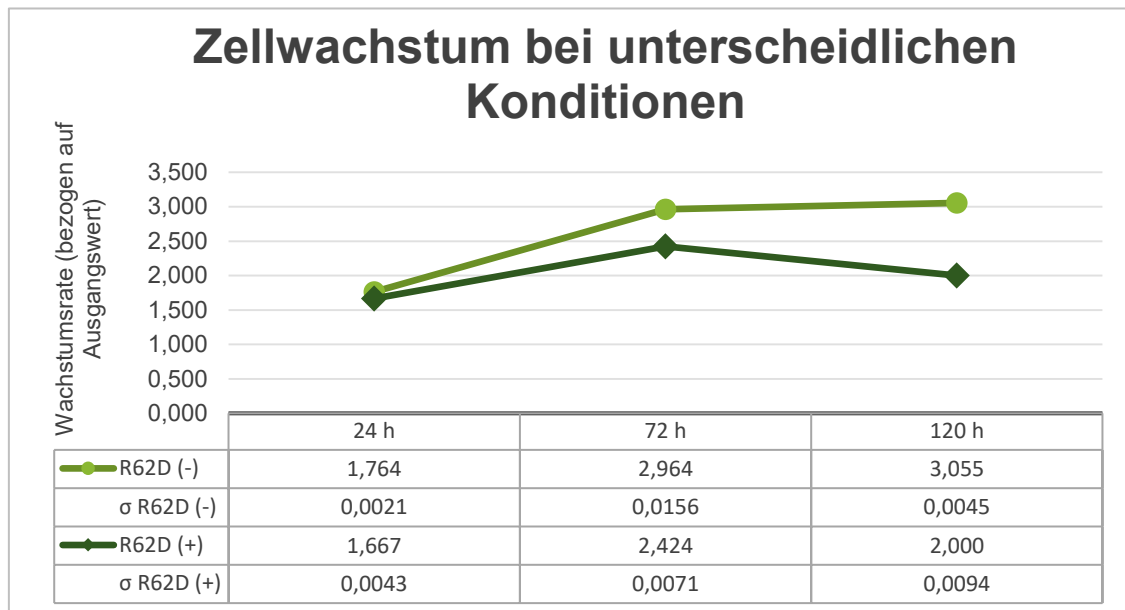


Abb. 23

#### **Abb. 23: Einfluss der R62D-Aktinmutante auf Proliferation von MCF-7 Zellen auf Plastikoberflächen nach Östrogenstimulation**

MCF-7 Zellen wurden auf 96-Well Platten ausgesät (1500 Zellen/Well) und entweder mit Doxycyclin (1 mg/ml) oder ohne Doxycyclin inkubiert und nach 24 Stunden wurde allen Proben  $10^{-7}$  M Östrogen zugefügt. Die Zellzahl wurde nach 24, 72 und 120 Stunden im Vergleich zum Ausgangswert mittels WST-Assay bestimmt. Die Experimente wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte der Proliferationsraten. (n= 1).

Für die Versuche im Soft-Agar-Assay wurden analog zum WST-Assay auch in diesem Versuch Zellen mit oder ohne R62D-Aktin-Expression miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die R62D-Aktinmutante auch unter nicht-adhärennten Bedingungen die Proliferation, bzw. das Kolonienwachstum reduzierte (Abb. 24a, Abb. 24b). Wenn man den Proben allerdings Östrogen zusetzte kam es auch in R62D-exprimierenden Zellen zu einer Zunahme der Kolonienzahl. Die Effekte waren insgesamt etwas schwächer ausgeprägt als unter den adhärennten Bedingungen auf Plastikoberflächen.

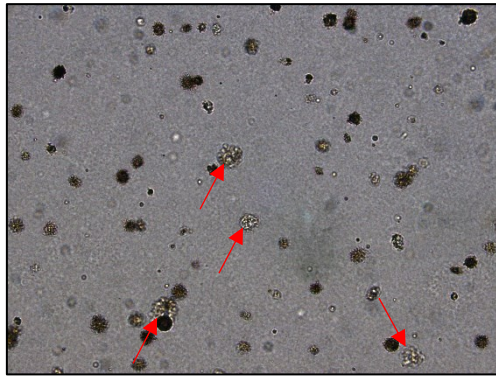


Abb. 24a – MCF-7 Wildtyp

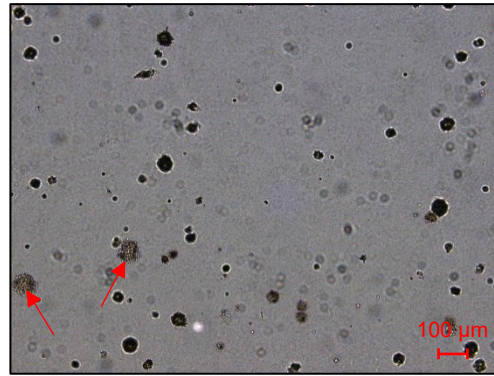


Abb. 24b – MCF-7 R62D

### Abb. 24: Kolonienwachstum von MCF-7 Wildtypzellen (Abb. 24a) im Vergleich zu R62D-Aktin exprimierenden Zellen (Abb. 24b) im Soft-Agar-Assay

Ausbildung von Kolonien im Soft-Agar nach 14 Tagen. Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte der Kolonien 14 Tage nach Einsäen von Einzelzellen. Die Pfeile markieren Kolonien  $> 60 \mu\text{m}$ , die später ausgezählt wurden (Skala  $100 \mu\text{m}$ ).

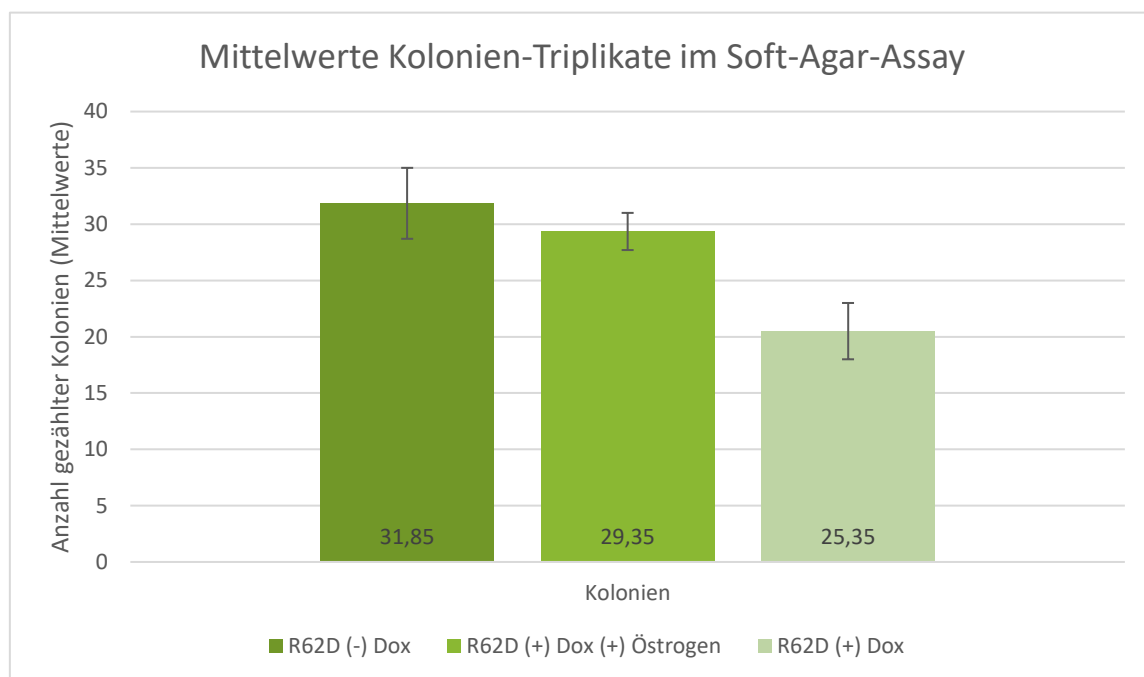


Abb. 25

### Abb. 25: Auswertung der Soft-Agar Experimente

Die Quantifizierung erfolgte durch mikroskopisches Auszählen von Kolonien  $> 60 \mu\text{m}$  (durch Pfeile in Abb. 24a und Abb. 24b markiert) durch zwei verblindete Untersucher. Die Normierung erfolgte auf die Kontrollzellen (R62(-) Dox) ( $n= 1$ ; MW + SD).

#### **4.3.2. Einfluss der R62D-Aktinmutante auf die Ausbildung nukleärer Aktinfilamente**

Hinsichtlich des Potentials der MCF-7 Zellen nukleäre Aktinnetzwerke zu bilden, wurde untersucht, ob die Expression der R62D-Aktinmutante die Ausbildung des nukleären Aktinnetzwerks beeinflussen würde. Aus Ergebnissen in NIH-3T3 Zellen war zu erwarten, dass es durch die nicht-polymerisierungsfähige Aktinmutante zu einer Abnahme nukleärer Filamente kommen müsste, tatsächlich zeigte die anschließende mikroskopische Auswertung der Proben eine deutliche Abnahme von MCF-7 Zellen mit nukleären Aktinnetzwerken bei Zellen mit R62D-Aktin im Vergleich zu den Kontrollzellen (s. Abb. 26). Hierbei wurde eine Konsistenz der Ergebnisse zu vorangegangenen Arbeiten mit NIH-3T3 Zellen ersichtlich. Der genannte Effekt war sowohl bei Zellen, ohne als auch Zellen mit zusätzlicher Östrogenstimulation zu erkennen. Des Weiteren konnte in diesem Experiment erneut der Einfluss von Östrogen auf die Anzahl der Filamente bildenden Zellen dargestellt werden. Dies wiederum entsprach den Proliferationsverhältnissen der unterschiedlichen Zellproben in den zuvor durchgeführten Soft-Agar- sowie WST-Assays (s. Abb. 23, Abb. 25).

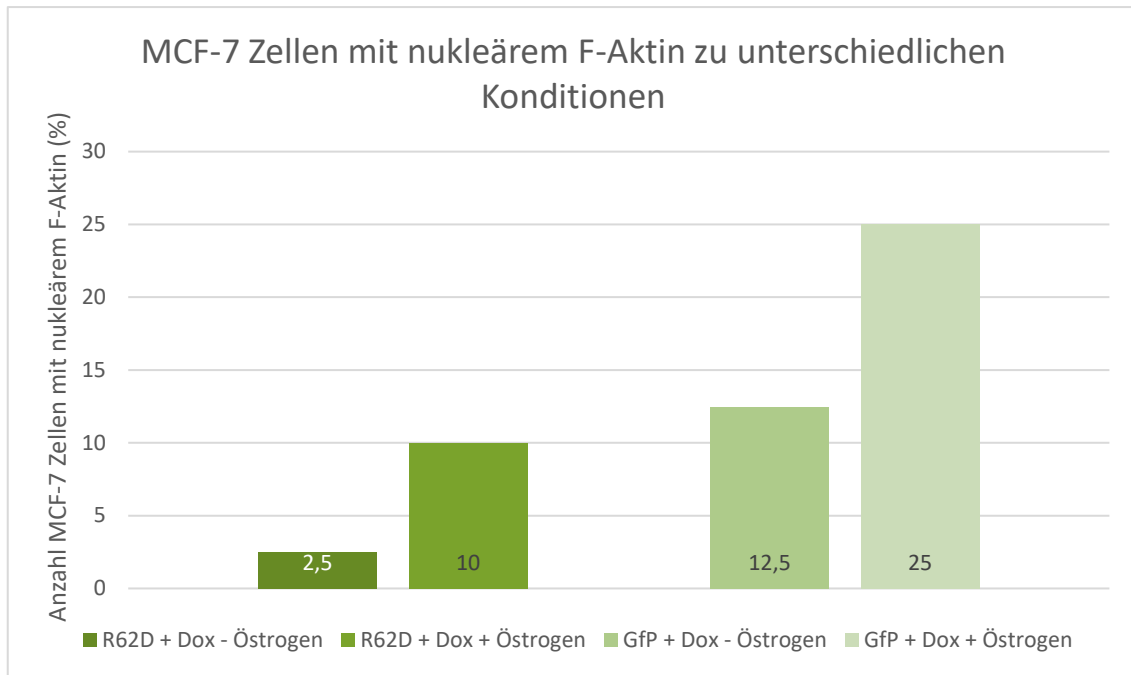


Abb. 26

#### **Abb. 26: Einfluss der Expression der R62D-Aktinmutante auf die Ausbildung nukleärer Aktinfilamente**

Die stabil transduzierten MCF-7 Zellen wurden mit Doxycyclin vorbehandelt und dann für 24 Stunden mit  $10^{-7}$  M Östrogen oder ohne Östrogen inkubiert. Zuvor erfolgte der oben erwähnte Starvierungsvorgang mit anschließender Färbung und Fixierung der Tumorzellen. Die Auszählung erfolgte verblindet (n=1; MW).

#### **4.4. Einfluss der nukleären Expression der R62D-Aktinmutante auf die Expression ausgewählter Östrogen-responsiver Gene**

Nach Zusammenschau der zuvor durchgeführten Experimente konnte ein deutlicher Einfluss von Östrogen sowohl auf das Proliferationsverhalten als auch auf das Potential der MCF-7 Zellen nukleäre Aktinnetzwerke zu bilden, beobachtet werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine dysfunktionale Aktinvariante (R62D-Aktin) nicht nur zu einer Proliferationsreduktion, sondern auch zu einem geringeren Prozentsatz an Tumorzellen mit nukleärem F-Aktin führt. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob eine Beeinträchtigung des nukleären Aktinnetzwerks einen Einfluss auf Gene mit Relevanz für Apoptose, Proliferation, Tumorsuppression und andere wichtige Effekte hat, bei denen Östrogen die Expression reguliert (Ikeda et al., 2014).

Die experimentell behandelten Gene werden in Tab. 7 aufgeführt.

Name	Gen	Genprodukt	Funktion
<b>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</b>	v-Fos	Bestandteil Transkriptionsfaktor AP-1	Onkogen, Zellzyklus, Apoptose, Proliferation
<b>Human v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog</b>	v-Jun	Bestandteil Transkriptionsfaktor AP-1	Onkogen, Zellzyklus, Apoptose, Proliferation
<b>Human forkhead box A1</b>	FOXA1	Forkhead Box Protein A1	„Öffnung“ von Chromatinstrukturen
<b>RAB17</b>	RAB17	Ras-related protein RAB17	Intrazelluläre Transportprozesse, Inhibierung Zellmigration
<b>Human Breast cancer 1, early onset</b>	BRCA1	BRCA1 protein	Tumorsuppressorgen
<b>Human tumor protein p53</b>	TP53	p53	Tumorsuppressorgen
<b>Myelocytomatosis oncogene</b>	Myc	Myc	Expressionsregulator
<b>Human B-cell CLL/lymphoma 2</b>	BCL2	BCL2	Apoptoseregulation

Tab. 7

**Tab. 7: Östrogen-responsive Gene mit dazugehörigem Genprodukt und wichtigen Funktionen**

Das **Fos**-Gen kodiert für ein gleichnamiges Protein, welches in der Lage ist mit **Jun** zu dimerisieren und anschließend den sogenannten AP-1 Komplex (Activating-protein-1 complex) zu bilden, welcher als Transkriptionsfaktor für diverse Target-Gene fungiert (Lu et al., 2005). Diese spielen wiederum eine entscheidende Rolle hinsichtlich wichtiger zellulärer Prozesse wie Zellzykluskontrolle, Proliferation und Apoptose (Piechaczyk & Blanchard, 1994).

**Jun** kodiert für ein gleichnamiges Protein, welches wie bereits erwähnt, Bestandteil des AP-1 Komplexes ist (Piechaczyk & Blanchard, 1994). Als solcher sind auch für Jun Beteiligungen an Funktionen wie Zellzykluskontrolle, Proliferation oder Apoptose bekannt (Mechta-Grigoriou, Gerald, & Yaniv, 2001).

Das **FOXA1** Gen kodiert für das FOXA1 Protein (Robinson et al., 2013). Proteine der Forkhead-Familie sind in der Lage stark verdichtete Chromatinstrukturen zu binden und diese für andere Transkriptionsfaktoren zugänglicher zu machen (Robinson et al., 2013).

**RAB17** kodiert für eine gleichnamige GTPase, welche den intrazellulären Transport von Proteinen und Lipiden reguliert und deren Expression als auf Zellen epithelialen Ursprunges limitiert gilt. Darüber hinaus wird für Rab17 eine Funktion bei der Erhaltung der Polarität epithelialer Zellen vermutet (von Thun et al., 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine supprimierte Expression von Rab17 zu gesteigerter Invasion von unterschiedlichen Tumorzelllinien, darunter auch Mammakarzinomzelllinien, führt (von Thun et al., 2011).

**BRCA1** fungiert als wichtiges Tumorsuppressorgen, welches bei familiär gehäuften Mamma- und Ovarialkarzinomen häufig mutiert (Keimbahnmutationen) vorliegt (Wu, Lu, & Yu, 2010).

**TP53** ist ein bekanntes Tumorsuppressorgen und hat die Funktion eines auf vielfältige Art und Weise wirksamen Transkriptionsfaktors (Børresen-Dale, 2003).

**Myc** hat in Zellen die Funktion eines Transkriptionsregulators für zahlreiche Target-Gene, welche mit Prozessen wie Zellwachstum und -proliferation, Apoptose, Zelldifferenzierung und metabolischen Signalwegen assoziiert sind (Conacci-Sorrell, Mc Ferrin, & Eisenman, 2014).

**Bcl2** kodiert für ein gleichnamiges Protein, welches für die Regulation der Apoptose in Zellen verantwortlich ist (Adams & Cory, 2018). Unterschieden werden Proteine der Bcl2-Familie, die das Zellüberleben fördern (BCL2, BCL-X) und Proteinen, die die Apoptose der Zelle begünstigen (BAX, BAK) (Adams & Cory, 2018). Die Anti-apoptotischen Proteine inhibieren in gesunden Zellen die pro-apoptotischen Proteine, was durch Einflussfaktoren wie Onkogen-Aktivierung oder DNA-Schädigungen (und p53

Aktivierung) aufgehoben werden kann (Adams & Cory, 2018). Die Einleitung der Apoptose vermitteln die pro-apoptotischen Bcl-Proteine über den sogenannten *intrinsischen* Weg, bei dem es zur Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien und anschließend zur Aktivierung von Caspasen kommt (Adams & Cory, 2018).

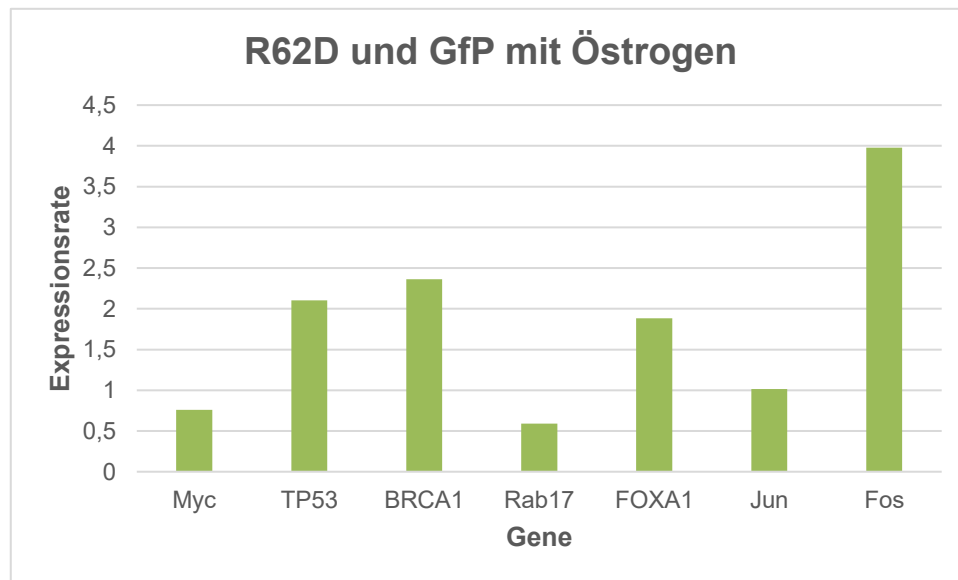


Abb. 27

#### **Abb. 27: Expressionsrate ausgewählter Gene bei MCF-7 Zellen mit R62D-Aktin nach Östrogenbehandlung**

Nach Östrogenbehandlung wurde mittels qPCR-Analyse die Expressionsrate der Gene bestimmt. Ein Wert von 1 bedeutet dabei, dass die Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen (GfP) gleichbleibend ist. Werte  $< 1$  stehen für eine verminderte und Werte  $> 1$  für eine vermehrte Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen. Nicht gezeigt werden Werte für Bcl2 aufgrund zu hoher Standardabweichung (s. Diskussionsteil).

Abbildung 27 zeigt den Unterschied in der Genexpression zwischen MCF-7 Zellen mit R62D-Aktin im Vergleich zu Kontrollzellen (MCF-7 mit Wildtyp-Aktin + GfP), jeweils mit Östrogenbehandlung ( $10^{-7}$  M). Ein Wert von 1 würde bedeuten, dass kein Unterschied besteht. Ein höherer Wert als 1 bzw. ein niedrigerer Wert sprechen für eine vermehrte bzw. verminderte Genexpression verglichen mit den Kontrollzellen.

Hierbei ist ersichtlich, dass TP53, BRCA1 und insbesondere Fos bei MCF-7 Zellen mit R62D-Aktin im Vergleich zu den Kontrollzellen vermehrt exprimiert werden.

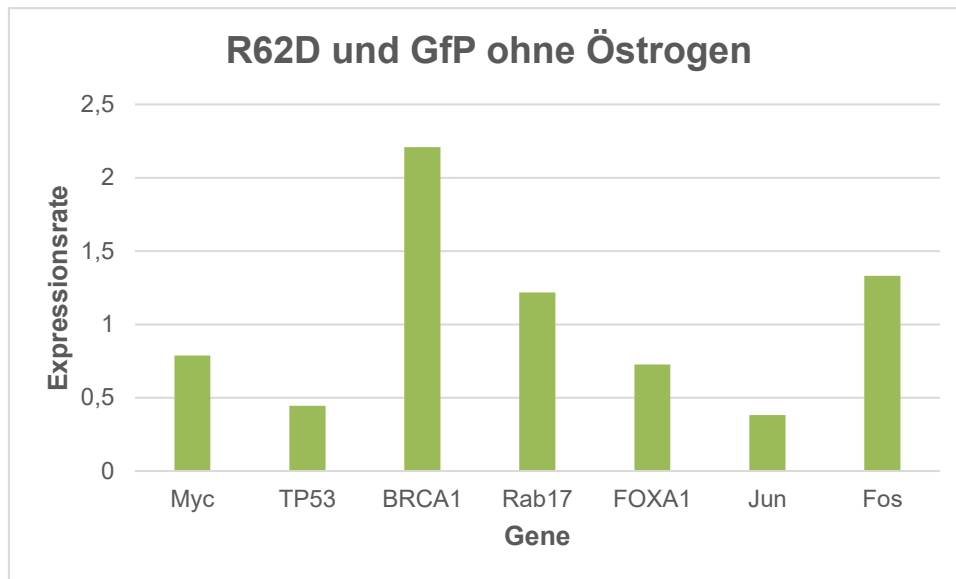


Abb. 28

#### **Abb. 28: Expressionsrate ausgewählter Gene bei MCF-7 Zellen mit R62D-Aktin ohne Östrogenbehandlung**

Ohne Behandlung mit Östrogen wurden in diesem Versuch MCF-7 Zellen mit R62D-Aktin mit den Kontrollzellen (GfP) verglichen. Analog zu Abbildung 27, bedeutet ein Wert von 1, dass kein Unterschied in der Expression zwischen den Proben besteht, Werte < 1 sprechen für eine verminderte Expression und Werte > 1 für eine vermehrte Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Abbildung 28 zeigt den Unterschied in der Genexpression zwischen den beiden Zelllinien jeweils ohne Östrogengabe. MCF-7 Zellen mit Wildtyp-Aktin und GfP dienen auch hier wieder als Kontrolle. Hier zeigte sich vor allem eine vermehrte Expression von BRCA1. Die Werte für TP53 (0,445) und Jun (0,382) zeigen eine als mehr um die Hälfte reduzierte Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Werden nun diese beiden Abbildungen miteinander verglichen zeigt sich, dass bei Östrogengabe eine vermehrte Expression von vor allem Fos in MCF-7 Zellen mit R62D-Aktin zu erkennen ist. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass ohne Östrogengabe, das Expressionslevel von Rab17 in MCF-7 Zellen mit R62D-Aktin doppelt so hoch ist, wie in selbigen Zellen mit Östrogengabe.

Ebenfalls ist erkennbar, dass mit Ausnahme der eben genannten Gene, eine geringere Expression der unterschiedlichen Gene in MCF-7 Zellen mit R62D-Aktin ohne Östrogen erfolgt.



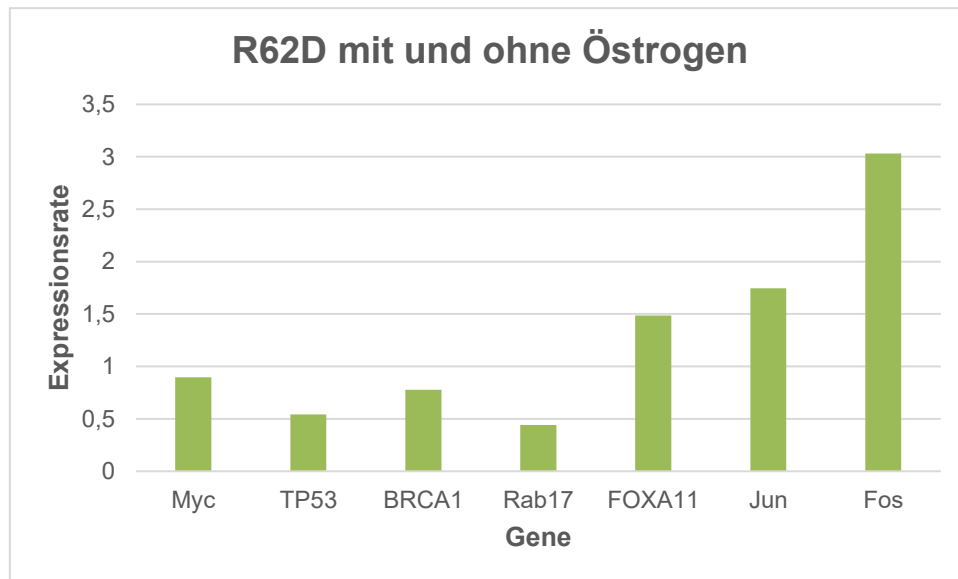


Abb. 29

### Abb. 29: Vergleich von MCF-7 Zellen mit R62D-Aktin mit und ohne Östrogenbehandlung

Für diesen Versuch erfolgte ein Vergleich zwischen zwei Proben von MCF-7 Zellen, welche beide R62D-Aktin exprimierten. Der Unterschied bestand darin, dass für eine Probe eine Östrogenbehandlung erfolgte, für die andere nicht. Die Probe ohne Östrogen wurde hierbei als Kontrolle verwendet. Die Zahlenwerte in der Abbildung entsprechen in ihrer Bedeutung den vorangegangenen Versuchen.

In der dritten Abbildung ist der Vergleich zwischen MCF-7 Zellen mit R62D-Aktin ohne Östrogen (Kontrolle) und mit Östrogen dargestellt. Hierbei zeigt sich eine gesteigerte Genexpression bei wiederum Fos bei Östrogengabe. Auch bei Jun und Human Forkhead ist eine, wenn auch eher geringgradige Zunahme der Genexpression zu verzeichnen.

## 5. Diskussion

Mit rund 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland (Stand 2014) stellt das Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung der Frau dar (Robert Koch-Institut e.V., Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2017). Rund 25% der erkrankten Frauen versterben infolge des Mammakarzinoms (Robert Koch-Institut e.V., Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2017). Dem Steroidhormon Östrogen kommt sowohl bei der Entstehung als auch der Progression und Metastasierung von bestimmten Arten des Mammakarzinoms eine zentrale Rolle zu

(Lipovka & Konhilas, 2016). Aufgrund dieses Sachverhalts ergibt sich zudem ein hoher Stellenwert für antihormonell wirksame Medikamente im Bereich der Mammakarzinom Therapie. Östrogen weist auf molekularer Ebene nachgewiesenermaßen eine Vielzahl von transkriptionellen Eigenschaften auf (Lipovka & Konhilas, 2016) und ist zudem als potenter Wachstumsstimulus bei Östrogenrezeptor-positiven Tumorzelllinien bekannt (Comşa et al., 2015). Hierbei sind insbesondere MCF-7 Zellen (Michigan Cancer Foundation-7) (Comşa et al., 2015) zu nennen, welche als Standard-Tumorzelllinie im Bereich der experimentellen Forschung zu der Wirkung von Östrogenen und Mammakarzinomen verwendet werden (Comşa et al., 2015).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte nachgewiesen werden, dass die humanen MCF-7 Zellen nukleäre Aktinfilamente aufweisen. Sowohl nach Serumstimulation als auch während der Mitose konnten entsprechende Strukturen fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden (s. Abb. 11, Abb. 12). Aktinfilamente sind als Teil des Zytoskeletts erheblich in Prozesse wie zelluläre Motilität, Adhäsion und Migration von Zellen beteiligt (Karp, 2005). Auch wurde in der Vergangenheit vielfach eine Beteiligung von Aktinstrukturen bei genregulatorischen Prozessen vermutet (Dekker & Misteli, 2015) (Hu et al., 2008). Eine Nachweisbarkeit von für diese Prozesse benötigten dynamischen F-Aktinstrukturen im Kern von Zellen, wurde jedoch bis 2013 (Baarlink, Wang, & Grosse, 2013) nicht erbracht. Auch die Funktion, sowie die Regulation von F-Aktin im Zellkern ist noch nicht vollständig erforscht (Falahzadeh et al., 2015).

In dieser Arbeit wurde erstmalig untersucht, ob MCF-7 Zellen nukleäre Aktinfilamente aufweisen, das Steroidhormon einen Einfluss auf die Bildung selbiger Strukturen aufweist und ob nukleäre Aktinfilamente eine Bedeutung für die Expressionsregulation von Östrogen-responsiven Genen innehaben.

Es konnte gezeigt werden, dass MCF-7 Zellen nach Vorbehandlung mit Östrogen vermehrt nukleäre Aktinfilamente nach Serumstimulation bilden (s. Abb. 18). Des Weiteren konnte dargestellt werden, dass Östrogen die Expression eines Aktin-Depolymerisierers (Cofilin) herunter zu regulieren vermag (s. Abb. 20, Abb. 21), was einen möglichen mechanistischen Erklärungsansatz für das vermehrte Auftreten des nukleären F-Aktins darstellt. Darüber hinaus zeigte sich, dass sowohl das bekanntermaßen Östrogen-responsive Onkogen BRCA1 bei Vorhandensein eines dysfunktionalen nukleären Aktins (R62D) (s. Abb. 27, Abb. 28, Abb. 29) als auch das Onkogen v-Fos bei gestörter nukleärer Aktin-Variante unter Östrogenbehandlung vermehrt exprimiert wird.

Wobei sich die Frage stellte ob die Expressionsregulation von Östrogen-responsiven Genen die Beteiligung von funktionalen nukleären Aktinfilamenten bedarf, was

hinsichtlich der Erlangung neuer Erkenntnisse über die Entstehung maligner Erkrankungen der Brustdrüse von Bedeutung wäre.

## 5.1. Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung von Aktinfilamenten in MCF-7 Zellen

Für die Visualisierung der nukleären Aktinfilamente wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Methoden genutzt. Für fixierte Präparate wurde Alexa Fluor 488 Phalloidin verwendet. Zur Visualisierung des Zellkerns wurde zudem anfänglich DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, blaue Fluoreszenz) verwendet. Für Live-Cell-Imaging-Versuche fand der Nuclear-Aktin-Chromobody, gekoppelt mit GFP (Green fluorescent Protein) Anwendung.

Phalloidin stellt für fixierte Präparate den Goldstandard da, da es sich durch eine hohe Bindungsaffinität zu F-Aktin auszeichnet (Melak, Plessner, & Grosse, 2017) und Aktinfilamente darüber hinaus zu stabilisieren vermag (Melak, Plessner, & Grosse, 2017). Dennoch kann es bei der Verwendung von Phalloidin zur Bildung von Artefakten kommen (Melak, Plessner, & Grosse, 2017), die genauestens von echten Aktinstrukturen unterschieden werden müssen. So muss bei der Generierung von fixierten Präparaten auch die Art der Fixierung beachtet werden. Fixierungen mittels Methanols können beispielsweise dazu führen, dass die ursprüngliche Konformation des F-Aktins verändert wird und dass es zur Bindung von Phalloidin an Artefakte kommt (Melak, Plessner, & Grosse, 2017). Während der Durchführung diverser Versuchsreihen mit fixierten Präparaten konnte zudem beobachtet werden, dass auch durch Fixierungen mittels Formaldehyds keine adäquate Visualisierung von F-Aktin im Zellkern erreicht werden konnte. Unter Verwendung von Glutaraldehyd zur Fixierung konnten derlei nachteilige Effekte kaum beobachtet werden. Dennoch bestand eine Schwierigkeit bei der Auszählung der für nukleäres Aktin positiven Zellen darin, dass eine Unterscheidung zwischen möglichen Artefakten oder sehr kleinen Aktinfilamenten bisweilen schwierig war. Eine Möglichkeit der Fehlerminimierung war hierbei fragliche Strukturen anderen Wissenschaftlern der sich mit nukleärem Aktin befassenden Arbeitsgruppe zu präsentieren. Eine andere Möglichkeit war, mittels verwendeten Computerprogramms (Zeiss black/blue) Messungen der Intensität des Farbsignals innerhalb des Zellkerns vorzunehmen, und diese dann mit der Signalstärke von eindeutig identifizierbaren nukleärem F-Aktin zu vergleichen. Problematisch ist hierbei jedoch, dass auch Artefakte durchaus ein intensives Farbsignal zeigen können, sodass eine genaue Unterscheidung auch mit dieser Methode nicht absolut sicher ist. Deshalb wurden Zellen mit Strukturen

im Zellkern, welche nicht eindeutig als Aktin identifiziert werden konnten, nicht in die Auswertungen aufgenommen. Weitere Kriterien, welche die Zellen aufweisen mussten, waren zudem eine adäquate Einsicht des Zellkerns (keine Überlagerung der Kernebene durch andere Zellen) und eine intakte Zellstruktur, da Zellen, welche zum Zeitpunkt der Apoptose fixiert wurden, vielfach Artefakte aufwiesen.

Ein weiterer Nachteil von Phalloidin ist, dass wenn Aktin von Proteinen wie Cofilin gebunden wird, Phalloidin nicht mehr binden kann und auf diese Weise lediglich ein geringerer Anteil der tatsächlich vorhandenen Aktinfilamente visualisiert werden kann (Melak, Plessner, & Grosse, 2017).

Aufgrund dieser Tatsache könnte angenommen werden, dass der in der Arbeit beschriebene Effekt, mehr Zellen mit nukleärem Aktin zu sehen, darauf beruht, dass das Phalloidin nur „ungebundenes“ F-Aktin visualisiert und dass durch eine Östrogengabe, was zu einer verminderten Cofilin-Expression führt, letztendlich mehr Aktinfilamente sichtbar werden, als ohne Östrogen. Hiergegen spricht jedoch, dass neben Cofilin noch eine Vielzahl weiterer Aktin-bindender Proteine bekannt sind, welche ebenfalls die Konformation des Aktins verändern und eine Bindung von Phalloidin an Aktinstrukturen stören könnten, sodass das Maß an Expression eines Proteins allein, höchstwahrscheinlich nicht zu gravierenden Effekten führt.

Angeführt werden muss jedoch ein weiterer Schwachpunkt des Phalloidins hinsichtlich dessen Bindung an F-Aktin. Es konnte gezeigt werden, dass filamentöses Aktin aus mindestens sieben Untereinheiten bestehen muss, damit es zu einer Bindung und somit Visualisierung kommen kann (Melak, Plessner, & Grosse, 2017). Sehr kleine, in Entstehung begriffene Filamente könnten somit übersehen werden (Melak, Plessner, & Grosse, 2017). Tatsächlich zeigen neue Untersuchungen aus dem Labor von Robert Grosse mit hoch-auflösenden Mikroskopen, dass dies der Fall ist (unveröffentlichte Daten).

Eine weitere Schwierigkeit bei der Anwendung von Phalloidin für serumstimulierte Zellen ist, dass nukleäre Aktinfilamente in einem äußerst schmalen Zeitfenster (wenige Sekunden bis Minuten) entstehen, welches mit der Fixierung genau abgepasst werden muss, damit nukleäres F-Aktin im Zellkern dargestellt werden kann. Hierbei ist zudem eine Variabilität je nach Zelllinie denkbar, weshalb für Versuche an anderen Zelllinien neben dem bewährten Zeitfenster durchaus weitere getestet werden müssten.

Über die Versuche an fixierten Zellen mit Östrogenvorbehandlung ist hervorzuheben, dass die sich ergebende und mehrfach reproduzierbare Dosis-Wirkungskurve mit

äußerst geringen Standardabweichungen der einzelnen Werte einer rein zufälligen Verteilung deutlich entgegensteht.

## 5.2. Problematik langzeit-kultivierter Tumorzelllinien

Die Zelllinie MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) wurde im Jahr 1973 aus einem malignen Pleuraerguss einer 69-Jährigen Frau kaukasischer Ethnie (ATCC, 2018) mit metastasiertem Mammakarzinom gewonnen (Comşa et al., 2015). Untersuchungen dieser Tumorzelllinie zeigten relevante Mutationen in Genen wie PIK3CA, CDKN2A (ATCC, 2018) (Sanger Institute, 2018). Die MCF-7 Zelllinie zeichnet sich durch eine hohe genetische Instabilität aus (Comşa et al., 2015), was erkennbar am Vorhandensein unterschiedlicher genetischer Profile ist (Comşa et al., 2015). Dies bedeutet, dass diverse MCF-7 Zelllinien sich neben dem Genexpressionsprofil auch in der Rezeptorexpression und Signalwegen unterscheiden können (Comşa et al., 2015). Wenn solche Abweichungen bei Tumorzelllinien auftreten, kann die Vergleichbarkeit von ein und derselben Tumorzelllinie zwischen diversen Laboren erschwert sein. Neu entstehende Veränderungen können vielfältigen Einfluss auf die gesamte zelluläre Funktion nehmen und zu abweichenden experimentellen Ergebnissen in unterschiedlichen Laboren führen, obwohl die Tumorzelllinien den gleichen Ursprung aufweisen. Dies ist auch für MCF-7 Zellen durch die American Type Culture Collection (ATCC) beschrieben worden (Belmont, 2010). Dabei handelt es sich beispielsweise um Aneuploidien, welche bei dem Vergleich unterschiedlicher MCF-7 Proben vorkamen (Belmont, 2010). Denkbar erscheint auch, dass derlei Anomalien innerhalb einer verwendeten Charge von Zellen kurzfristig auftreten und dies zu einer deutlich erschwerten Reproduzierbarkeit von Ergebnissen führt. Auch bei Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass Ergebnisse oftmals dann reproduzierbar waren, wenn längerfristig kultivierte MCF-7 Zellen gegen eine neu in Kultur gebrachte Charge ausgetauscht wurden.

Hervorzuheben ist bei dem für diese Arbeit durchgeführten Versuch zur Visualisierung nukleärer Aktinfilamente nach Vorbehandlungen mit unterschiedlichen Östrogenkonzentrationen, dass eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit unterschiedlichen Chargen von MCF-7 Zellen, sowohl aus dem Vorrat des pharmakologischen Instituts in Marburg als auch aus dem Labor von Prof. Offermanns aus dem MPI Bad Nauheim erzielt werden konnte.

### 5.3. Adaptation von laborspezifischen Arbeitsschritten im Umgang mit Östrogen-responsiven Tumorzellen

Für die Kultivierung diverser Zelllinien existieren unterschiedliche Nährmedien. Ein häufig verwendetes Nährmedium stellt dabei das Phenolrot enthaltende Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) dar. Phenolrot wird in Zellkulturmedien als pH-Indikator genutzt, welcher eine entsprechende Änderung dieses Wertes in Form von Farbumschlägen zu gelb (  $\text{pH} < 1$  ) oder rot-violett (  $\text{pH} > 6$  ) anzeigt.

Die Verwendung von Phenolrot haltigen Nährmedien ist im Umgang mit östrogensensitiven Zelllinien jedoch nicht unproblematisch. Untersuchungen an östrogensensitiven Zelllinien haben gezeigt, dass Phenolrot eine Wirkung ähnlich derer von schwachen Östrogenen haben kann (Berthois et al., 1986). Da zu Beginn der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit auch Nährmedium mit Phenolrot verwendet wurde, ist es nicht auszuschließen, dass hierdurch eine Beeinflussung von Ergebnissen vorgelegen hat. Diese ist jedoch allenfalls geringfügig anzusehen, da Wiederholungsversuche mit Phenolrot freiem Nährmedium kohärente Ergebnisse aufwiesen. Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass eine absolut östrogenfreie Kultivierung der Zellen kaum möglich sein dürfte, da das verwendete fetale Kälberserum als Naturprodukt nicht nur Östrogene enthält, sondern diese auch in schwankender Konzentration.

### 5.4. Real Time PCR Versuche

Die Messung der Expression der ausgewählten Gene erfolgte mittels Real Time PCR. Für die Aussagekraft der Ergebnisse sind unterschiedliche Faktoren wie die Standardabweichung der Ergebnisse, bezogen auf das verwendete Housekeeping-Gen (hier TATA-Box-Binding-Protein), sowie die Anzahl der durchgeführten Versuche relevant. Für jedes in dieser Arbeit untersuchte Gen wurden die Proben in Duplikaten angelegt. Als aussagekräftig wurden jene Ergebnisse gewertet, bei denen die Standardabweichung  $< 2$  war. Aufgrund dessen wurden die Ergebnisse für Bcl2 ( $\sigma = 2,77$ ) nicht mit in die Auswertung aufgenommen. Die Messung der Expression von BCL2 sollte daher unter den gleichen Bedingungen wiederholt werden. Damit eine Steigerung der Expressionsrate eines Gens als signifikant angesehen wurde, musste selbige mindestens doppelt so hoch sein, wie der Expressionswert in den Referenzzellen. Die Expression des FOXA1-Gens (Abb. 27) ist daher lediglich als Trend anzusehen (Wert

1,88) und sollte ebenfalls wiederholt werden. Auch wenn für andere Gene geringe Standardabweichungen gemessen wurden, ist eine Wiederholung des Experiments unerlässlich, um eine weitere Fehlerminimierung herbeizuführen.

## 5.5. Der Einfluss von Östrogen auf die Quantität von Zellen mit nukleärem F-Aktin

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von fixierten Präparaten zeigten, dass abhängig von der zur Vorbehandlung verwendeten Östrogenkonzentration, MCF-7 Zellen in unterschiedlichem Ausmaß nukleäre Aktinfilamente zeigten (s. Abb. 17, Abb. 18) Zur Anfärbung der Zellen war Alexa Fluor 488 Phalloidin verwendet worden. Bei der Durchführung der Experimente zeigte sich eine starke Anfälligkeit der MCF-7 Zellen für äußerliche Einflussfaktoren, wie beispielsweise die Dauer der Kultivierung der Zellen in Nährmedium und dem damit einhergehendem Risiko einer Kontamination. Diese führten zu einer Dysfunktion von ansonsten standardisierten Reaktionen von MCF-7 Zellen auf Östrogenbehandlung, was sich im Verlauf der experimentellen Phase dieser Arbeit anhand von einem ausbleibendem Proliferationsschub nach Östrogenbehandlung zeigte. In diesem Falle war auch eine Visualisierung von nukleären Aktinfilamenten bei fixierten Präparaten nicht möglich.

## 5.6. Gene

Das BRCA1-Gen, welches in mutierter Form eine zentrale Rolle hinsichtlich des Risikos an einem Mammakarzinom zu erkranken einnimmt (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2018), wies im Rahmen der Real Time PCR Versuche eine verstärkte Expression, vor allem bei Zellen mit dysregulierter nukleärer Aktinvariante (R62D) im Vergleich zu Zellen mit Wildtyp-Aktin auf (s. Abb. 27, Abb. 28, Abb. 29). Da BRCA1 bekanntermaßen ein Östrogen-responsibles Gen ist (Ikeda et al., 2014), ist es zudem interessant, dass wenn Zellen mit exprimiertem R62D-Aktin mit und ohne Östrogen verglichen werden, der expressionsverstärkende Effekt von Östrogen erkennbar ist (s. Abb. 29). Da es sich bei BRCA1 um ein Tumorsuppressorgen handelt (Wu, Lu, & Yu, 2010) kann angenommen werden, dass es sich bei der gesteigerten Expression in R62D-exprimierenden Zellen, um eine Reaktion auf die non-Funktionalität des Aktins handelt. Bekräftigt wird diese Annahme auch dadurch, dass auch ein anderes Tumorsuppressorgen (Børresen-Dale, 2003), TP53, verstärkt exprimiert wird, wenn

R62D-exprimierende Zellen mit Östrogen behandelt werden. Auch das Fos-Gen, welches unter anderem an zentralen Prozessen wie Apoptose und Regulierung der Zellteilung beteiligt ist (Piechaczyk & Blanchard, 1994), wird unter gleichen Bedingungen vermehrt exprimiert. Somit ist denkbar, dass als Reaktion auf eine Dysfunktion einer essenziellen zellulären Komponente (Aktin) Reparaturmechanismen, oder gar Apoptose der Zellen angestoßen wird (zellulärer Stress). Ein eindeutiger Beweis für die Beteiligung eines funktionalen nukleären Aktinnetzwerks bei der Steuerung der Expression dieser drei genannten Östrogen-responsiven Gene ist hiermit aber noch nicht belegt.

Als interessant anzusehen ist jedoch, dass für das FOXA1-Gen ein Trend zur vermehrten Expression (s. Abb. 27) bei gestörter nukleärer Aktinvariante vorliegt. Bekanntermaßen mit Steroidhormonen wie Östrogenen und Androgenen interagierend, konnte gezeigt werden, dass genomische Veränderungen des FOXA1-Gens Konsequenzen für die Entstehung als auch Therapie von Mamma- und Prostatakarzinomen haben können (Robinson et al., 2013). FOXA1 hat nicht nur die Rolle eines Transkriptionsfaktors inne, sondern ist ebenfalls in der Lage an hochkonservierte Abschnitte des Chromatins zu binden (Robinson et al., 2013) und die DNA in diesem Bereich zugänglicher für andere Transkriptionsfaktoren zu machen (Robinson et al., 2013). So führt FOXA1-Silencing auch in MCF-7 Zellen nachweislich zu geringerer Zugänglichkeit der DNA (Robinson et al., 2013), wodurch ebenfalls die Bindung von Östrogenrezeptoren an die DNA und damit verbundene transkriptionelle Aktivitäten sowie die Proliferation der Zellen eingeschränkt wird (Robinson et al., 2013). Im Umkehrschluss führt dies zu der Annahme, dass FOXA1 einen Marker für eine gute Prognose bei Mammakarzinomen darstellt, da die Expression dieses Proteins zu einem erhaltenen Östrogenkomplex mit adäquater Ansprechbarkeit auf anti-hormonelle Therapien führt, was in mehreren Studien nachgewiesen werden konnte (Robinson et al., 2013). Genomische Veränderungen von FOXA1, wie Amplifizierung oder Mutationen könnten sich ebenfalls auf unterschiedliche Weise auf maligne Erkrankungen auswirken (Robinson et al., 2013). So ist bei mehreren unterschiedlichen Tumoren gezeigt worden, dass die Region des FOXA1 Gens auf Chromosom 14 amplifiziert ist (Robinson et al., 2013) Insbesondere Metastasen von Prostata- und Mammakarzinomen können FOXA1 Amplifikationen aufweisen (Robinson et al., 2013). Mutationen des Gens können zu einer veränderten Bindungsaffinität des FOXA1 Proteins führen, was beispielsweise zu einer gestörten Östrogensensibilität bis hin zu Östrogen-unabhängigem Tumorwachstum bei Mammakarzinomzellen führen könnte (Robinson et al., 2013), was diese Art der Tumore gleichzeitig weniger sensibel gegenüber anti-hormonellen Therapien werden lässt (Robinson et al., 2013).



Bei Prostatakarzinomen scheinen die Quantität und Qualität der FOXA1-Expression andere Effekte zu haben als bei Mammakarzinomen (Robinson et al., 2013). Zwar führt auch hier ein Silencing des Gens zur verminderten Proliferation der Zellen (Robinson et al., 2013), jedoch kann der Androgenrezeptor immer noch an die DNA binden, jedoch mitunter an anderen Regionen, was wiederum zu Veränderungen hinsichtlich transkriptioneller Targets führt (Robinson et al., 2013). Anders als bei Mammakarzinomen sind hohe Level von FOXA1 bei Prostatakarzinomen ein Marker für eine schlechte Prognose (Robinson et al., 2013).

Eine intensiviertere Untersuchung von Forkhead-Proteinen bei unterschiedlichen Zelllinien, wie beispielsweise auch Prostatakarzinomzelllinien mit veränderter Aktinvariante könnten weitere Aufschlüsse über die Interaktion dieser Proteinfamilie mit nukleärem Aktin und dessen Folgen geben. Dabei wären insbesondere Experimente zum Proliferationsverhalten und dessen Abhängigkeit von Steroidhormonen, sowie Experimente zur Invasionsfähigkeit (Metastasierung) der unterschiedlichen Zellen interessant.

In Bezug auf die qPCR Versuche ist festzuhalten, dass es sich um n=1 Experimente handelt. Die Ergebnisse welche Pilotcharakter haben sind somit als Trend zu werten. Um belastbare Ergebnisse zu erhalten sollten die Experimente wiederholt werden.

## 5.7. Ausblick

### 5.7.1. Screening weiterer Zelllinien auf nukleäres F-Aktin

Um die Entstehung, Beeinflussung und Funktion von nukleären Aktinnetzwerken besser beurteilen zu können, ist die Untersuchung weiterer Zelllinien essenziell. Neben Tumorzellen unterschiedlicher Herkunft und unterschiedlicher Eigenschaften, wie Ansprechbarkeit auf Steroidhormone, wäre auch das Anlegen von Primärkulturen interessant. Hierbei könnten Ergebnisse unter möglichst natürlichen Bedingungen generiert werden.

### 5.7.2. Androgen-responsive Tumorzellen

Der Androgenrezeptor (AR) gehört wie der Östrogen-, Progesteron-, Mineralcorticoid- und Glucocorticoidrezeptor zu den nukleären Steroidhormonrezeptoren (Tan et al.,

2014). Äquivalent zum Östrogenrezeptor, ist auch der Androgenrezeptor als Transkriptionsfaktor anzusehen (Lipovka & Konhilas, 2016) (Tan et al., 2014). Im Fall der Bindung von Androgenen an diesen Rezeptor werden eine Vielzahl von Prozessen, wie die Entwicklung eines männlichen Phänotyps oder auch die Differenzierung der männlichen Geschlechtsorgane angestoßen (Tan et al., 2014). Auch die Zellen der Prostata (Vorsteherdrüse), welche als exokrine Drüse ein Sekret als Teil des Spermas produziert, besitzen Androgenrezeptoren (Tan et al., 2014). Die Bindung von Androgenen führt zur Proliferation der Prostata-Zellen, welche beim gesunden Mann mit der Apoptose der Zellen im Gleichgewicht steht (Tan et al., 2014). Im Falle des Prostatakarzinoms kommt es zum Überwiegen der Proliferation von Prostata-Zellen (Tan et al., 2014). Mit rund 60.000 Neuerkrankungen pro Jahr (Robert Koch-Institut e.V., Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2017) stellt das Prostatakarzinom die häufigste maligne Erkrankung des Mannes dar, wodurch sich auch für diese Erkrankung eine besondere Relevanz hinsichtlich der weiteren Erforschung und Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten ergibt. Ähnlich wie bei Mammakarzinomen, finden bei der Therapie von Prostatakarzinomen anti-hormonelle Strategien Anwendung (Tan et al., 2014).

Der Androgenrezeptor und seine Funktion verdienen demnach eine große Aufmerksamkeit hinsichtlich der Entstehung und Progression von Prostatakarzinomen. Ein bekanntes Beispiel für eine mit dem AR assoziierte Dysfunktion, welche zur Karzinomentstehung führt, ist die androgenabhängige Hochregulierung von Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie (E-twenty-six) (Tan et al., 2014). Hierbei kommt es zu einer Fusion zwischen dem von AR reguliertem TMPRSS2-Genpromoter und der kodierenden Region von ERG (Erythroblast-transformation-specific) und ETV1 (ETS-Variant 1) (Tan et al., 2014). Genannte Fusion kommt bei geschätzt 50% aller Prostatakarzinome vor und führt zur Ansprechbarkeit genannter ETS-Transkriptionsfaktoren auf Androgene, was in einer Zellzyklus-Progression mündet (Tan et al., 2014). Die Induktion dieses Prozesses an sich ist selbst abhängig von dem Recruitment mehrerer Androgen-abhängiger Enzyme (activation-induced cytidine deaminase (AID), LINE-1 repeat-encoded ORF2 endonuclease, und topoisomerase II beta (TOP2B) (Tan et al., 2014), welche eine zur Fusion führende chromosomale Translokation bewirken (Tan et al., 2014). Wie in dieser Arbeit schon zuvor erwähnt (s. Kapitel 2.8. „Nukleäre Aktinfilamente als möglicher dynamischer Bestandteil der Genexpression und ihrer Regulierung“) findet auch hier eine Form der Interaktion zwischen Chromosomen statt. Auch in diesem Fall wäre es daher interessant zu erforschen, ob nukleäre Aktinfilamente eine Funktion bei dieser Interaktion aufweisen

könnten. Dies ist deshalb aufgrund der Existenz von *castration-resistant prostate cancer* (CRPC) relevant (Tan et al., 2014).

Patienten, bei denen ein CRPC vorliegt, zeigen kein Ansprechen mehr auf anti-hormonelle Therapien und haben dementsprechend ein schlechteres Outcome (Tan et al., 2014). Betreffende Patienten sind in diesem Falle oftmals auf Docetaxel-haltige Chemotherapeutika angewiesen (Tan et al., 2014). Die exakten Mechanismen der Entstehung von CRPC sind derzeit noch nicht vollkommen erforscht, eine zentrale Rolle des AR scheint jedoch denkbar (Tan et al., 2014).

Weiterführende Experimente mit androgen-responsiven humanen Tumorzellen wie beispielsweise LnCaP (Derivate einer Lymphknotenmetastase bei zugrundeliegendem Prostatakarzinom) (ATCC, 2018) sind unter dem Gesichtspunkt der Rolle von nukleären Aktinfilamenten bei chromosomalen Interaktionen durchaus denkbar.

### 5.7.3. **SbCl<sub>2</sub> Melanomzellen**

Wie bereits im Ergebnisteil dieser Arbeit erwähnt, konnten nukleäre Aktinfilamente im Zellkern der Melanomzelllinie SbCl<sub>2</sub> mikroskopisch nachgewiesen werden. Bei SbCl<sub>2</sub> Zellen handelt es sich um Melanomzellen, bei denen eine Mutation für N-Ras vorliegt (Sanger Institute, 2018).

Auch bei dieser Zelllinie erfolgte eine Serumstimulation nach vorangegangener Starvierung, analog zu den Stimulierungsversuchen ohne Östrogen der MCF-7 Zellen. Der Unterschied in der Kultivierung der Zelllinien bestand hierbei in der Verwendung eines speziell-angefertigten Nährmediums der Melanomzellen. Das verwendete Nährmedium enthielt einen geringeren Serumanteil (2%). Verglichen mit einem Standard-Nährmedium wie verwendet für die MCF-7-Zellen, war der Anteil des CaCl<sub>2</sub> am Gesamtvolumen des Melanom-Mediums ähnlich dem des fetalen Kälberserums (Capricorn Scientific GmbH, 2019).

Hierbei wurden zunächst Versuche durchgeführt, bei denen während der Starvierungsphase der CaCl<sub>2</sub>-Anteil reduziert wurde und anschließend, analog zu einem Serum-Stimulationsversuch, mit CaCl<sub>2</sub> stimuliert und anschließend fixierte Präparate angefertigt wurden. Da dabei allerdings keine nukleäre Filamentbildung auszumachen war, wurden im Folgenden Serumstimulationsversuche durchgeführt, bei denen nukleäre Aktinfilamente dargestellt werden konnten (s. Abb. 11b, Ergebnisteil). Als problematisch erwies sich während der Kultivierung der Zellen eine sich äußert zügig einstellende Kontamination des Nährmediums, am ehesten durch Hefepilze, welche zum

raschen Absterben der Zellen führte. Auch nach mehrmaligem Neu-Ansetzen des Nährmediums unter sterilen Bedingungen zeigten sich stets neue Kontaminationen. Da aufgrund dieses Sachverhalts eine Kontamination der Zellen an sich nicht auszuschließen war, ist ein Erwerb einer neuen SbCl<sub>2</sub>-Zelllinie für weitere Untersuchungen anzustreben.

Generell ist zudem festzuhalten, dass weitere Untersuchungen dieser Zelllinie anzustreben sind, da das Maligne Melanom derzeit die fünfthäufigste Tumorerkrankung beider Geschlechter in Deutschland darstellt (s. Tab. 1, Einleitung) (Robert Koch-Institut e.V., Die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2015) und eine steigende Anzahl an Neuerkrankungen in den nächsten Jahren zu erwarten ist (Robert Koch-Institut e.V., Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2017).

#### **5.7.4. Genom-wide Sequencing**

Eine Ausweitung auf das gesamte Genom zu der Untersuchung des möglichen Einflusses nukleärer Aktinnetzwerke auf die Genregulation in humanen (Tumor-) Zellen ist als künftiger Schritt denkbar. Dabei könnte die Expression von Genen sowohl im Zusammenhang mit externen Stimuli wie Steroidhormonen, oder aber unabhängig davon untersucht werden. Wie im Einleitungsteil dieser Arbeit erwähnt, sind zudem grundlegende Mechanismen wie die X-Inaktivierung in weiblichen Säugern derzeit noch nicht vollständig erforscht. Hier wäre es denkbar, derlei Prozesse bei Zellen mit dysfunktionaler nukleärer Aktinvariante zu untersuchen.

#### **5.7.5. Chromatinreorganisation MCF-7**

Die von Plessner et al. durchgeführte Experimente zur Chromatinreorganisation in NIH-3T3, MCF10a, RTE-1 und HT180 Zellen sollte künftig auch bei MCF-7 Zellen durchgeführt werden. Hierbei wäre zudem zu eruieren, ob eine Vorbehandlung mit dem als Transkriptionsfaktor wirksamen Steroidhormon Östrogen, einen Einfluss auf das beschriebene Geschehen zeigt und ob abweichende Prozesse in Tumorzellen im Vergleich zu anderen Zellen zu beobachten sind.

Dabei wären auch weiterführende Untersuchungen mittels 3C-Assay, wie bei Hu et al. (s. „Nukleäre Aktinfilamente als möglicher dynamischer Bestandteil der Genexpression und ihrer Regulierung“) oder auch Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierungs-Analysen (FISH)

interessant, um weitere Informationen über mögliche chromosomale Interaktionen und Interaktionspartner zu erhalten.

Die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) ist ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, innerhalb von einzelnen Zellen, Metaphase und Interphase-Chromosomen (Cui, Shu, & Li, 2016). Eine DNA-Sonde wird mit einem Marker versehen und bindet in der zu untersuchenden Zielstruktur an eine komplementäre Ziel-DNA (Cui, Shu, & Li, 2016). Als Sonden-Marker werden im Fall der FISH fluoreszierende Farbstoffe verwendet (Cui, Shu, & Li, 2016). Durch binden der Sonde an der Ziel-DNA, kann dort somit ein Fluoreszenz-Signal nachgewiesen werden (Cui, Shu, & Li, 2016). Von Vorteil ist bei dieser Methode, dass unter Verwendung von verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen gleichzeitig mehrere Gene von Interesse auf einem Chromosom dargestellt werden können (Cui, Shu, & Li, 2016). Hervorzuheben ist zudem, dass sich die FISH als diagnostisches Tool durch eine hohe Sensitivität und Spezifität auszeichnet (Cui, Shu, & Li, 2016). Deletionen, Duplikationen und Translokationen, welche zu Fusionen von Genen führen wie bei der chronisch myeloischen Leukämie (BCR/ABL1-Fusion), können ebenfalls durch eine FISH detektiert werden (Cui, Shu, & Li, 2016). Daher findet die FISH auch zunehmend in der onkologischen Diagnostik Anwendung (Cui, Shu, & Li, 2016). Auch Hu et al. verwendeten die FISH um nachzuweisen, dass Östrogen eine Änderung der räumlichen Anordnung zweierlei unterschiedlicher Gene zu bewirken scheint (s. Kapitel 2.8. „Nukleäre Aktinfilamente als möglicher dynamischer Bestandteil der Genexpression und ihrer Regulierung“). Für die Forschung an nukleären Aktinfilamenten als mögliche dynamische Komponente bei der räumlichen Annäherung von mehreren Genen aneinander, könnte diese Methode somit zur Visualisierung der Gene, beispielsweise vor und nach Manipulation von nukleären Aktinstrukturen zum Vergleich, verwendet werden.

Die 3C (Chromosome-conformation-capture) Methode dient der Untersuchung der räumlichen Organisation des Chromatins (Dekker & Misteli, 2015). Der Gedanke bei dieser Methode ist, dass auf dreidimensionaler Ebene diverse Gen-Loci miteinander interagieren, diese jedoch bei linearer Betrachtung des Genoms mitunter tausende Kilobasen voneinander entfernt liegen können (Dekker & Misteli, 2015). Interaktionen beispielsweise zwischen bestimmten Promotoren und Enhancern wären somit nachweisbar.

Zunächst erfolgt eine Quervernetzung von räumlich nahe-aneinanderlegenden DNA-Abschnitten und Proteinen, welche mit ihnen interagieren. Im Anschluss erfolgt eine Fragmentation des Chromatins durch Restriktionsenzyme (Dekker & Misteli, 2015). Danach findet eine Verdünnung der Reagenzien mit erneuter Ligation statt, sodass

anstatt zufälliger Ligationen nur „echte“ intramolekulare Ligationen zustande kommen (Dekker & Misteli, 2015). Zuletzt werden die Quervernetzungen durch Erhitzen der Reagenzien auf 95°C gebrochen und die DNA anschließend aufgereinigt (Dekker & Misteli, 2015). Insgesamt findet also eine Verschmelzung von miteinander interagierenden Gen-Loci statt (Dekker & Misteli, 2015). Diese können dann im Anschluss durch quantitative Methoden wie PCRs nachgewiesen werden (Dekker & Misteli, 2015). Die 3C Methode ist also eine denkbare Möglichkeit um Interaktionen nicht nur zwischen einzelnen Genen, sondern auch zwischen Promotoren, Enhancern und weiteren Elementen darzustellen, an denen nukleäre Aktinfilamente beteiligt sein könnten. Im Falle des castration-resistent prostate cancer (CRPC) (s. Kapitel 5.7.2. „Androgen-responsive Tumorzellen“), bei dem nachweislich eine androgenabhängige Fusion eines Promoters mit Transkriptionsfaktoren stattfindet, könnte man hierbei einen Einfluss von nukleären Aktinstrukturen auf dieses Geschehen untersuchen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Erforschung von nukleären Aktinfilamenten eine zunehmend bedeutendere Stellung einnimmt. Die bereits generierten Forschungsergebnisse sollten auf weitere humane Zelllinien, insbesondere auf verschiedene Tumorzelllinien ausgedehnt werden, da nukleäre Aktinfilamente an einer Vielzahl von essenziellen Mechanismen bei der Reparatur von DNA und bei der Genregulation beteiligt zu sein scheinen. Hieraus könnten sich völlig neue Erklärungsansätze für die unterschiedlichsten Erkrankungen und nicht zuletzt neue therapeutische Möglichkeiten für Selbige ergeben.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adams, J. M., & Cory, S. (2018). The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role. (N. Research, Hrsg.) *Cell Death and Differentiation*(25(1)), S. 27-36. doi:10.1038/cdd.2017.161
- ATCC. (2018). *atcc.org*. (ATCC, Hrsg.) Abgerufen in 2018 von [https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/Cell\\_Lines\\_by\\_Gene\\_Mutation.ashx](https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/Cell_Lines_by_Gene_Mutation.ashx)
- Baarlink et al., C. (November 2017). A transient pool of nuclear F-actin at mitotic exit controls chromatin organization. (N. P. Group, Hrsg.) *Nature Cell Biology*(19(12)), S. 1389-1398. doi:10.1038/ncb3641
- Baarlink, C., Brandt, D., & Grosse, R. (Juli 2010). SnapShot: Formins. (Elsevier, Hrsg.) *Cell*(142(1)), S. 172. doi:10.1016/j.cell.2010.06.030
- Baarlink, C., Wang, H., & Grosse, R. (Mai 2013). Nuclear Actin Network Assembly by Formins Regulates the SRF Coactivator MAL. (A. A. Science, Hrsg.) *Science*(340(6134)), S. 864-866. doi:10.1126/science.1235038
- Bamburg, J. R., & Bernstein, B. W. (August 2010). Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. (S. N. Group, Hrsg.) *Faculty of 1000 Biology Reports*(19(2)), S. 62. doi:10.3410/B2-62
- Baselga et al., J. (Oktober 2017). Advances in the management of HER2-positive early breast cancer. (Elsevier, Hrsg.) *Critical Reviews in Oncology / Hematology*(119), S. 113-122. doi:10.1016/j.critrevonc.2017.10.001
- Belmont, A. S. (September/Oktober 2010). Estrogen fueled, nuclear kiss. (L. Bioscience, Hrsg.) *Nucleus*(1(5)), S. 440-443. doi:10.4161/nucl.1.5.13051
- Berthois et al., Y. (April 1986). Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. (N. A. Sciences, Hrsg.) *Pnas (Proceedings of the National Academy of Sciences)*(83(8)), S. 2496-2500. doi:10.1073/pnas.83.8.2496
- Borowicz et al., S. (Oktober 2014). The Soft Agar Colony Formation Assay. (M. J. Corp., Hrsg.) *Jove (Journal of Visualized Experiments)*(27(92)). doi:10.3791/51998
- Børresen-Dale, A.-L. (2003). TP53 and Breast Cancer. (W.-L. o. Society, Hrsg.) *Human Mutation*(21(3)), S. 292-300. doi:10.1002/humu.10174

- Capricorn Scientific GmbH. (2019). *Capricorn Scientific*. Abgerufen in 2019 von [http://www.capricorn-scientific.com/fileadmin/content/Product\\_Information/Product\\_Info\\_DMED-HXRXA.pdf](http://www.capricorn-scientific.com/fileadmin/content/Product_Information/Product_Info_DMED-HXRXA.pdf)
- Caridi et al., C. (Juli 2018). Nuclear F-actin and myosins drive relocalization of heterochromatic breaks. (N. P. Group, Hrsg.) *Nature*(559(7712)), S. 54-60. doi:10.1038/s41586-018-0242-8
- Comşa et al., Ş. (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. (I. I. Research, Hrsg.) *Anticancer Research*(35(6)), S. 3147-3154.
- Conacci-Sorrell, M., McFerrin, L., & Eisenman, R. N. (2014). An Overview of Myc and its Interactome. (C. S. Press, Hrsg.) *Cold Spring Harbour Perspectives in Medicine*(4(1)). doi:10.1101/cshperspect.a014357
- Cui, C., Shu, W., & Li, P. (September 2016). Fluorescence In situ Hybridization: Cell-Based Genetic Diagnostic and Research Applications. (F. i. Biology, Hrsg.) (4(89)). doi:10.3389/fcell.2016.00089
- Das et al., A. T. (Mai 2016). Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. (B. Science, Hrsg.) *Current Gene Therapy*(16(3)), S. 156-167. doi:10.2174/1566523216666160524144041
- Dekker, J., & Misteli, T. (2015). Long-Range Chromatin Interactions. (C. S. Press, Hrsg.) *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology*(7(10)). doi:10.1101/cshperspect.a019356
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. (September 2018). *AWMF online - Das Portal der wissenschaftlichen Medizin*. (D. K. Deutsche Krebsgesellschaft, Hrsg.) Abgerufen in 2018 von S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>
- Falahzadeh et al., K. (2015). The Potential Roles of Actin in The Nucleus. (C. Press, Hrsg.) *Cell Journal*(17(1)), S. 7-14. doi:10.22074/cellj.2015.507
- Fletcher et al., D. (Januar 2010). Cell mechanisms and the cytoskeleton. (N. P. Group, Hrsg.) *Nature*(463). doi:10.1038/nature08908
- Graefe, K. H., Lutz, W., & Bönisch, H. (2011). *Duale Reihe - Pharmakologie und Toxikologie*. Georg Thieme Verlag KG.



- Hildinger, M. (Mai 1999). Entwicklung retroviraler Vektoren für den Einsatz in der Gentherapie. Hamburg: Universität Hamburg.
- Horibata et al., S. (Mai 2015). Utilization of the Soft Agar Colony Formation Assay to Identify Inhibitors of Tumorigenicity in Breast Cancer Cells. (M. J. Corp., Hrsg.) *Jove (Journal of Visualized Experiments)*(99), S. 52727. doi:10.3791/52727
- Hu et al., Q. (Dezember 2008). Enhancing nuclear receptor-induced transcription requires nuclear motor and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. (U. S. Sciences, Hrsg.) *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences)*(105(49)), S. 19199-19204. doi:10.1073/pnas.0810634105
- Ikeda et al., K. (Dezember 2014). Identification of estrogen-responsive genes based on the DNA binding properties of estrogen receptors using high-throughput sequencing technology. (N. P. Group, Hrsg.) *Acta Pharmacologica Sinica*(36(1)), S. 24-31. doi:10.1038/aps.2014.123
- Karp, G. (2005). *Molekulare Zellbiologie*. Heidelberg: Springer Verlag.
- Lake et al., C. M. (September 2013). The Development of a Monoclonal Antibody Recognizing the *Drosophila melanogaster* Phosphorylated Histone H2A Variant (γ-H2AV). (G. S. America, Hrsg.) *G3 Genes Genomes Genetics*(3(9)), S. 1539-1543. doi:10.1534/g3.113.006833/-/DC1
- Lange et al., A. (Februar 2007). Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interaction with Importin α. (S. P. Group, Hrsg.) *Journal of Biological Chemistry*(282(8)), S. 5101-5105. doi:10.1074/jbc.R600026200.
- Liedtke, C. (Februar 2017). Fortgeschrittenes triple-negatives Mammakarzinom - Immuntherapien in Prüfung. (D. Ärzteblatt, Hrsg.) *Perspektiven der Onkologie*(114(24)), S. 14-16. doi:10.3238/PersOnko/2017.06.16.03
- Lipovka, Y., & Konhilas, J. P. (2016). The complex nature of oestrogen signalling in breast cancer: enemy or ally? (S. Verlag, Hrsg.) *Bioscience Reports*(36(3)). doi:10.1042/BSR20160017
- Lu et al., C. (Juli 2005). cFos is critical for MCF-7 breast cancer cell growth. (N. P. Group, Hrsg.) *Oncogene*(24(43)), S. 6516-6524.
- Mechta-Grigoriou, F., Gerald, D., & Yaniv, M. (2001). The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. (N. P. Group, Hrsg.) *Oncogene*(20(19)), S. 2378 - 2389. doi:10.1038/sj.onc.1204381

- Meerbrey et al., K. L. (März 2011). The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo. (U. S. Sciences, Hrsg.) *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences)*(108(9)), S. 3665-3670. doi:10.1073/pnas.1019736108/-/DCSupplemental
- Melak, M., Plessner, M., & Grosse, R. (2017). Actin visualization at a glance. (T. C. Ltd., Hrsg.) *Journal of Cell Science*(130(3)), S. 525-530. doi:10.1242/jcs.189068
- Nasrazadani et al., A. (Mai 2018). Precision Medicine in Hormone. (F. M. SA, Hrsg.) *Frontiers in Oncology*(4(8)), S. 144. doi:10.3389/fonc.2018.00144
- Percipalle, P., & Visa, N. (März 2006). Molecular functions of nuclear actin in transcription. (T. Misteli, Hrsg.) *The Journal of Cell Biology*(172(2)), S. 967-971. doi:10.1083/jcb.200512083
- Piechaczyk, M., & Blanchard, J.-M. (1994). C-Fos Proto-Oncogene Regulation and Function. (Elsevier, Hrsg.) *Critical reviews in Oncology/Hematology*(17(2)), S. 93-131.
- Plessner, M., Melak, M., Chinchilla, P., Baarlink, C., & Grosse, R. (Mai 2015). Nuclear F-Actin Formation and Reorganization upon Cell Spreading. (A. S. Biology, Hrsg.) *The Journal of biological chemistry*(290(18)), S. 11209-11216. doi:10.1074/jbc.M114.627166
- Pollard, T. D. (März 2016). Actin and Actin-Binding Proteins. (C. S. Press, Hrsg.) *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology*(8(8)). doi:10.1101/cshperspect.a018226
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., & Deutzmann, R. (2012). *Duale Reihe - Biochemie* (3. Auflage Ausg.). Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag KG.
- Robert Koch-Institut e.V., Die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland. (2015). *Krebs in Deutschland 2011/2012*. (D. G. Robert Koch-Institut e.V., Hrsg.) doi:10.17886/rkipubl-2015-004
- Robert Koch-Institut e.V., Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland. (2017). *Krebs in Deutschland 2013/14*. (R. Koch-Institut, & G. d. e.V., Hrsg.) doi:10.17886/rkipubl-2017-007
- Robinson et al., J. L. (Februar 2013). FOXA1 mutations in hormone-dependent cancers. (F. M. SA, Hrsg.) *Frontiers in Oncology*(3), S. 20. doi:10.3389/fonc.2013.00020
- Sanger Institute. (2018). COSMIC - Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer - Cell Lines Project. Hinxton, Vereinigtes Königreich. Abgerufen in 2018 von [https://cancer.sanger.ac.uk/cell\\_lines](https://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines)

- Schrank et al., B. (Juli 2018). Nuclear ARP 2/3 drives DNA break clustering for homology-directed repair. (N. P. Group, Hrsg.) *Nature*(559(7712)), S. 61-66. doi:10.1038/s41586-018-0237-5
- Sigma-Aldrich. (2018). *Cell Proliferation Reagent WST-1*. Abgerufen in 2018 von Sigmaaldrich.com:  
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/cellproro?lang=de&region=DE>
- Tan et al., M. E. (Juni 2014). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer. (N. P. Group, Hrsg.) *Acta Pharmacologica Sinica*(36(1)), S. 3-23. doi:10.1038/aps.2014.18
- Terpe, K. (Oktober 2005). *Transfektion*. (L.-V. G. KG, Herausgeber) Abgerufen in 2018 von LaborJournal:  
<https://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v59.lasso>
- Thomas, C., & Gustafsson, J.-Å. (August 2011). The different roles of ER subtypes. (S. Verlag, Hrsg.) *Springer Nature*(12(2)), S. 149. doi:10.1038/nrc3093
- von Thun et al., A. (2011). ERK2 drives tumour cell migration in three-dimensional microenvironments by suppressing expression of Rab17 and liprin-β2. (T. C. Ltd., Hrsg.) *Journal of Cell Science*(125), S. 1465–1477. doi:10.1242/jcs.092916
- Wang et al., Z. (August 2019). GPER stabilizes F-actin cytoskeleton and activates TAZ via PLCβ-PKC and Rho/ROCK-LIMK-Cofilin pathway. (Elsevier, Hrsg.) *Biochem Biophys Res Commun*(513(3)), S. 976-982. doi:10.1016/j.bbrc.2019.06.132
- Wu, J., Lu, L.-Y., & Yu, X. (Dezember 2010). The role of BRCA1 in DNA damage response. (S. Verlag, Hrsg.) *Protein Cell*(1(2)), S. 117-123. doi:10.1007/s13238-010-0010-5
- Yamaguchi, H., & Condeelis, J. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. (Elsevier, Hrsg.) *Biochimica et Biophysica Acta*(1773(5)), S. 642–652. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.07.001
- Yuen et al., G. S. (März 2011). LIM Kinase Mediates Estrogen Action on the Actin Depolymerization Factor Cofilin. (Elsevier, Hrsg.) *Brain Research*(1379), S. 44-52. doi:10.1016/j.brainres.2010.07.067
- Zhang et al., C. (Juni 2013). Myocardin-related transcription factor A is up-regulated by 17β-estradiol and promotes migration of MCF-7 breast cancer cells via

transactivation of MYL9 and CYR61. (Elsevier, Hrsg.) *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*(45(11)), S. 921-927. doi:10.1093/abbs/gmt104.

## 7. Anhänge

## 7.1. Meine akademischen Lehrenden in Marburg

Prof. Dr. med. Detlef Bartsch

Dr. med. Christoph Best

Prof. Dr. med. Michael Bette

Prof. Dr. med. Yalcin Cetin

Prof. Dr. med. Frank Czubayko

Prof. Dr. Dr. med. Jürgen Daut

Dr. Markus Eickmann

Dr. Beate Feuser

PD Dr. Barbara Fritz

Prof. Dr. med. Max Geraedts

Prof. Dr. med. Robert Grosse

Prof. Dr. med. Michael Hertl

Dr. med. Marc Irqsusi

Prof. Dr. med. Tilo Kircher

Prof. Dr. Roland Lill

Prof. Dr. med. Michael Lohoff

Prof. Dr. med. Rolf F. Maier

Prof. Dr. med. Roland Moll

Prof. Dr. Dr. med. Ulrich Mueller

Prof. Dr. Bernhard Neumüller

Prof. Dr. Johannes Oberwinkler

Prof. Dr. med. Axel Pagenstecher

Prof. Dr. Timothy Plant

PD Dr. Regina Preisig-Müller

Prof. Dr. med. Harald Renz

Prof. Dr. med. Manfred Riß

Prof. Dr. med. Steffen Ruchholtz

Prof. Dr. Irmtraud Sahmland

Prof. Dr. med. Bernhard Schieffer

Prof. Dr. med. Walter Sekundo

Dr. med. Selim Sevinc

Prof. Dr. med. A. Teymoortash

Prof. Dr. Kati Thieme

Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. Hilke Vorwerk

Prof. Dr. med. Uwe Wagner

PD Dr. Reiner Westermann

Prof. Dr. med. Thomas Worzfeld

Dr. Christian Wrocklage

Prof. Dr. med. Hinnerk Wulf

## 7.2. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Personen bedanken die mich während der Anfertigung sowie Fertigstellung meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben. Insbesondere danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Czubayko für die interessante fachliche Beratung und Betreuung während meiner Arbeit. Für die Unterstützung bei praktischen Arbeiten im Labor möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der ehemaligen AG Grosse bedanken, insbesondere bei Matthias Plessner für die Erklärungen zur Generierung guter mikroskopischer Bilder. Auch bedanken möchte ich mich bei Andrea Wüstenhagen und Marga Losekam für das geduldige Beibringen aller wichtigen praktischen Dinge im Labor. Insgesamt bin ich dankbar für die schöne, stressige aber oftmals auch lustige Zeit im Labor und dafür im Institut als Doktorandin freundlich aufgenommen worden zu sein. Abschließend danke ich meinem Ehemann Manuel Schnurbus dafür mehr als geduldig mit mir gewesen zu sein und mich jedes Mal motiviert zu haben mein Bestes zu geben.